

Valkuaistason ja aminohapotäydennysten vaikutus sinikettujen rehun sulavuuteen ja typen hyväksikäyttöön

Jenni Sipilä
Maisterintutkielma
Helsingin Yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kotieläinten ravitsemustiede
Toukokuu 2019

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tdk.		Laitos/Institution – Department Maataloustieteiden osasto	
Tekijä/Författare – Author Jenni Sipilä			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Valkuaistason ja aminohapotäydennysten vaikutus sinikettujen rehun sulavuuteen ja typen hyväksikäyttöön			
Oppiaine / Läroämne – Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterin tutkielma	Aika/Datum – Month and year Toukokuu 2019	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 51 s.	
Tiivistelmä/Referat – Abstract <p>Tämän tutkielman tavoitteena oli tutkia rehun vähäisen valkuaispitoisuuden ja aminohapotäydennysten vaikutusta ravintoaineiden sulavuuteen ja valkuaisen hyväksikäyttöön siniketuilla loppukasvatusvaiheessa. Tavoitteena on sinikettujen valkuaisruokinnan optimointi, jotta rehukustannuksia ja ravinnepestöjä saataisiin pienennettyä.</p> <p>Tutkimus toteutettiin Kannuksessa Luova Oy:n tutkimustilalla 21.-28.10.2016. Kokeeseen valittiin 20 urossinikettua, jotka jaettiin viiteen käsittelyryhmään. Käsittelyt olivat: kontrolli (valkuaista 24% metabolisesta energiasta (ME)), valkuainen 20% ME:stä, valkuainen 20% ME:stä + metioniini, valkuainen 16% ME:stä + metioniini sekä valkuainen 16% ME:stä + metioniini ja histidiini. Eläimet olivat kokeen ajan yksittäin metaboliahäikeissä, joissa niiltä saatiin kerättyä sonta ja virtsa. Ravintoaineiden näennäistä sulavuutta tutkittiin kokonaiskeruumenetelmällä. Välittömästi lopetuksen jälkeen ohutsuolen viimeisen kolmanneksen sisältö kerättiin ja näytteestä määritettiin aminohappojen näennäinen ohutsuolisulavuus. Valkuaisen hyväksikäyttöä tutkittiin typpitasemenetelmällä. Lopetusta edeltävänä päivänä eläimiltä otettiin verinäytteet, joista määritettiin plasman aminohapot ja urea.</p> <p>Ravintoaineiden sulavuudessa ei havaittu suurta vaihtelua valkuaisen vähentyessä, paitsi valkuaisen sulavuus heikkeni yhdeksän prosenttiyksikköä kontrollin ja alimman valkuaikeksen omaavan ryhmän välillä. Typen hyväksikäyttö parani valkuaisen vähentyessä. Virtsan mukana eritetyn typen määrä väheni valkuaispitoisuuden vähentyessä mutta typen pidätyksessä ei ollut eroja. Metioniinin, histidiinin, lysiinin ja kysteiinin sulavuudessa havaittiin eroja, mutta muiden aminohappojen sulavuuteen koekäsittelyt eivät vaikuttaneet. Aminohapotäydennykset paransivat kyseisten aminohappojen sulavuutta merkittävästi. Plasman ureapitoisuudessa ei ollut eroja, mutta joidenkin aminohappojen osalta plasman pitoisuudet vähenivät valkuaisen vähentyessä.</p> <p>Valkuaisen vähentäminen ei vaikuttanut muiden ravintoaineiden kuin valkuaisen sulavuuden heikentymiseen. Valkuaismäärän väheneminen ei vaikuttanut typen pidätykseen eli pienempikin valkuaisen määrä tyydytti siniketun valkuaikeksen loppukasvatusvaiheessa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Sinikettu, metioniini, histidiini, ohutsuolisulavuus, kokonaissulavuus, typpi, raakavalkuainen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Maataloustieteiden osasto, Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tutkimuksen toteutus: Luova Oy, Kannus. Hankkeen rahoittaja: Helven säätiö. Tutkielman ohjaus: Professori Jarmo Valaja, Helsingin yliopisto sekä tohtorikoulutettava Vappu Ylinen, Helsingin yliopisto			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Jenni Sipilä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Influence of different protein levels and supplementary amino acid on nutrient digestibility and nitrogen utilization in blue foxes			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis	Aika — Datum — Month and year May 2019	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 51 p.	
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>The aim of this thesis was to study the effect of low protein and amino acid supplementation in feed on nutrient digestibility and protein utilization in blue foxes at the end of the growing-furring season. The aim is to optimize protein intake to reduce feed costs and nutrient emissions.</p> <p>The study was conducted at Luova Oy research center in Kannus between 21st and 28th of October in 2016. Twenty male blue foxes were chosen for the study and they were divided in five treatment groups. Treatment groups were: control (protein 24% of metabolizable energy (ME)), protein 20% of ME, protein 20% of ME + methionine supplement, protein 16% of ME + methionine supplement and protein 16% of ME + methionine and histidine supplement. Animals were in single metabolic cages, which provided the chance to collect the faeces and urine. We studied total apparent digestibility of nutrients. After euthanizing the animals, we collected the digesta from the end of the ileum and amino acids' apparent ileal digestibility were analysed. The day before euthanizing the animals, blood samples were collected for amino acid and urea analyse.</p> <p>There were no large changes in nutrient digestibility with lower protein content except for protein, which reduced nine percent between control and the treatment group that had the lowest protein content. The utilization of nitrogen increased with lower protein content. The amount of excreted nitrogen reduced with lower protein content but the level of retained nitrogen remained the same. The digestibility of methionine, histidine, lysine and cysteine increased significantly with amino acid supplementation. The treatment did not affect to plasma urea content.</p> <p>Lower content of protein decreased the protein digestibility. The reduction in protein content did not affect nitrogen retention, i.e. a smaller amount of protein satisfied the protein requirement of blue foxes at the end of the growing stage.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords bluefox, methionine, histidine, ileal digestibility, total track digestibility, nitrogen, protein			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Agricultural Sciences, Viikki Campus Library			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Supervisors: Professor Jarmo Valaja and doctoral student Vappu Ylinen			

LYHENTEET JA SYMBOLIT.....	5
1 JOHDANTO	6
2 SINIKETUN KASVATUS JA RUOKINTA.....	7
2.1 SINIKETUN TUOTANTO JA KASVATUS	7
2.2 RUOKINTA JA SEN VAIKUTUS TUOTANTO-OMINAISUUksiIN.....	7
2.3. VALKUAISRUOKINTA.....	9
2.3.1 VALKUAISEN TARVE JA SULAVUUS	9
2.3.2 VALKUAISEN LAATU	10
2.3.3 DL-METIONIINI JA L-HISTIDIINI	11
2.3.4 TYPEN ERITYS.....	12
2.4 VALKUAISRUOKINNAN VAIKUTUS YMPÄRISTÖÖN	13
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	15
4 AINEISTO JA MENETELMÄT	16
4.1 KOEAIKA- JA PAIKKA.....	16
4.2 KOEJÄRJESTELYT JA -ELÄIMET	16
4.3 REHUT JA RUOKINTA.....	17
4.4 NÄYTTEIDEN KERUU JA KÄSITTELY	21
4.4.1 VIRTSA-NÄYTTEET	21
4.4.2 SONTA-NÄYTTEET	21
4.4.3 OHUTSUOLINÄYTTEET	22
4.4.4 REHUNÄYTTEET	22
4.4.5 VERINÄYTTEET	23
4.5 TULOSTEN LASKEMINEN JA TILASTOLLISET ANALYYSIT.....	23
5 TULOKSET.....	25
5.1 REHUIEN KEMIALLINEN KOOSTUMUS	25
5.2 RAVINTOAINEIDEN SULAVUUS	28
5.3 AMINOHAPPOJEN SULAVUUS.....	29
5.4 TYPEN HYVÄKSIKÄYTTÖ	33
5.5 VERIPLASMAN AMINOHAPPO- JA UREAPITOISUUDET	35
6 TULOSTEN TARKASTELU	37
6.1 RAVINTOAINEIDEN SULAVUUS	37
6.2 AMINOHAPPOJEN SULAVUUS.....	39
6.3 TYPEN HYVÄKSIKÄYTTÖ	41
6.4 VERIPLASMAN AMINOHAPPO- JA UREAPITOISUUDET	42
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	44
KIITOKSET	45
LÄHTEET	46

LYHENTEET JA SYMBOLIT

AIA	acid insoluble ash, happoon liukenematon tuhka
Celite	piioksidi
KA	kuiva-aine
ME	metabolinen energia
N	typpi
3-MH	3-metyylihistidiini

1 JOHDANTO

Tutkimus oli osaprojekti laajempaa sinikettujen ruokinnan optimointi projektia. Toisessa osaprojektissa tarkasteltiin valkuaisen vähentämisen vaikutusta sinikettujen kasvuun ja nahanlaatuun loppukasvatusvaiheessa sekä kolmannessa osaprojektissa siitossinikettujen kasvukäyrän ja siitospainon vaikutusta lisääntymistulokseen. Tämän tutkielman käsittelemässä osaprojektissa tarkasteltiin rehun valkuaisen optimointia tuotannon loppuvaiheessa, joka on tärkeä turkin ja nahan valmistumisen kannalta.

Turkistuotanto on Suomessa merkittävä elinkeino. Suomi on suurin tarhaketun tuottajamaa tuottamalla noin puolet maailman tarhaketuista. Parempaa tuotosta tavoitellaan pääasiassa suurella pentuekoolla, suurella nahan koolla sekä hyvällä nahan laadulla. Siniketun kokoa onkin kasvatettu kovaa vauhtia viimeiset vuosikymmenet. Suurempi ketun koko ei tarkoita pelkästään suurempaa nahan arvoa mutta myös suurempaa rehun kulutusta. Suurempi rehun kulutus tarkoittaa tarhalle suurempia tuotantokustannuksia ja ympäristölle suurempaa ravinnekuormitusta. Valkuainen on rehun komponenteista kallein ja myös haastavin saada. Rehun suuri valkuaispitoisuus nostaa rehun hintaa entisestään ja lisää ympäristöön päätyvän typen määrää. Ylimääräisen valkuaisen ja sen sisältämän typen eläin erittää erityisesti virtsan mukana ympäristöön, eikä näin ollen ylimääräisestä valkuaisesta ole eläimen kasvun kannalta hyötyä.

Valkuaisen vähentäminen suoraan johtaa joidenkin aminohappojen saannin vajaukseen verrattuna eläimen tarpeeseen, mikä voi aiheuttaa kasvun ja turkin laadun heikkenemistä. Ennen rehun valkuaispitoisuuden vähentämistä eläimen aminohappojen tarve loppukasvatuksen aikana täytyy siis selvittää. Rehuseoksen aminohappojen optimoinnin mahdollistaa markkinoilla olevat synteettiset aminohapot. Mahdollisimman vähäinen typen erittyminen saadaan aikaan optimoimalla rehun valkuaispitoisuus ja aminohapot, vaikuttamatta kuitenkaan negatiivisesti eläimen kasvuun ja turkin kehittymiseen.

Nykyiset siniketun ruokintasuositukset perustuvat valkuaisen osalta kokonaissulavan raakavalkuaisen osuuteen metabolisesta energiasta (ME). Aminohapposuosituksia ei ole saatavilla, eikä näin ollen suositukset huomioi eläinten aminohappotarvetta.

2 SINIKETUN KASVATUS JA RUOKINTA

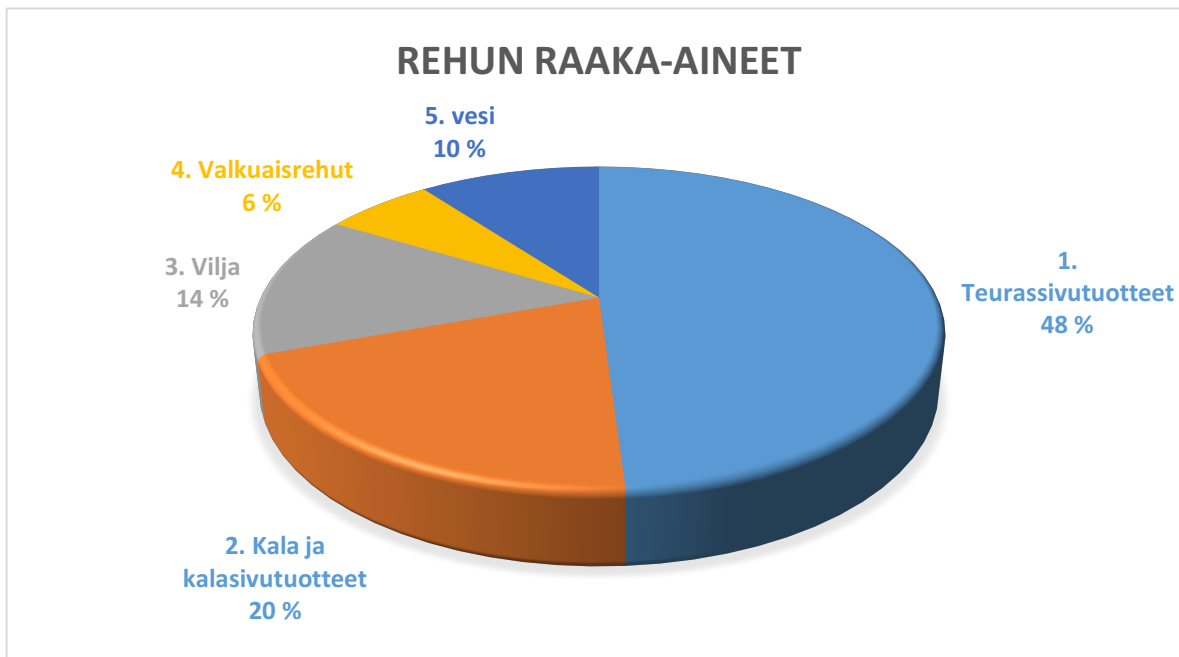
2.1 SINIKETUN TUOTANTO JA KASVATUS

Ensimmäiset tarhatut arktiset ketut pyydystettiin jo ennen 1900-lukua Alaskassa. Euroopassa arktista kettua eli naalia on alettu kasvattaa 1900-luvun alussa, jota risteytettiin myöhemmin Alaskalaisen värimuunnoksen, siniketun kanssa. Suomessa siniketun kasvatusta alkoi 1920-luvulla. 1960-luvulla ketunahan tuotanto tehostui rehun tuotannon ja logistiikan tehostumisen myötä. Yhden vuosikymmenen aikana 1970-luvulla tuotanto kasvoi noin kahdestakymmenestä tuhannesta noin 1,1 miljoonaan ketunnahkaan. (Hernesniemi ja Knutar, 2000)

Nykyään ketunnahkoja tuotetaan vuosittain noin kaksi miljoonaa kappaletta, joista suurin osa on siniketun nahkaa. Näin ollen Suomi kattaa noin puolet maailmalla tuotetuista tarhaketuista. Tilikaudella 2016-2017 turkisten välitysmyyntin arvo ylsi 437 miljoonaan euroon ja veroja turkiselinkeinolla kertyi esimerkiksi vuonna 2014 peräti 48,1 miljoonaa euroa, joten turkistuotannon voi sanoa olevan Suomessa edelleen merkittävä elinkeino (Toimintakertomus 2015/2016 sekä 2016/2017 SagaFurs Oy, ProFur 2017). Suomen johtavan aseman selittää turkiseläinten kasvattamisen pitkä historia sekä maailmalla arvostusta saava erinomainen turkiksen laatu. Turkiseläintuotanto on monissa maissa tänä päivänä kiellettyä tai taloudellisesti kannattamatonta, mikä selittää osaltaan myös Suomen johtavaa asemaa turkistuotannossa.

2.2 RUOKINTA JA SEN VAIKUTUS TUOTANTO-OMINAISUUKSIIN

Silveniuksen ym. (2011) tekemän raportin mukaan turkiseläinten ruokinta koostuu pääosin teurassivutuotteista, kalasta ja kalanjalostuksessa muodostuneista sivutuotteista, viljasta, valkuaisrehusta sekä vedestä, jonka avulla muokataan rehun kuiva-ainepitoisuutta.



Kuva 1. Siniketun rehun pääasialliset raaka-aineet. (Silvenius ym. 2011)

Pääasialliset tavoitteet sinikettujen kasvatuksessa ovat suuri pentuekoko, suuri nahan koko sekä nahan hyvä laatu. Näihin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa tarhalla tehtävien jalostusvalintojen lisäksi ruokinnalla. Siniketun kokoa onkin kasvanut 1970-luvun noin seitsemästä kilogrammasta nykyiseen noin 15 kilogrammaan. Koon kasvua selittää osittain tarhoilla tehty jalostustyö, sillä mitä suurempi ketun ja nahan koko sitä suurempi on sen taloudellinen arvo (Kempe ym., 2010). Osasyynä tähän on kuitenkin ruokinnan muutos. Rasvan määrä rehussa on kasvanut huomattavasti viime vuosina. Tämä on johtanut lihavuusongelmiin, sillä kettu on luonnostaan hyvä keräämään rasvaa nahan alle energiavarastoksi talvea varten. Lihavuusongelmat näkyvät poimuttuneena ihona, tulehduksina sekä heikentyneenä jalkaterveytenä ja hedelmällisyytenä (Peura, 2004; Kempe ym. 2010; Bengts, 2008).

Ketunnahantuotannossa suurin kustannus muodostuu ruokinnasta (Hernesniemi, 2000), jonka osuus tuotettua nahkaa kohden on 140-170 kg ja rahassa mitattuna se vaihtelee 23-48 euron välillä (Hernesniemi luentomateriaali, 2017). Heikentyneen jalkaterveyden ja hedelmällisyyden lisäksi lihavuus aiheuttaa suuremmat rehukustannukset, sillä suurilla ketuilla rehun kulutus on suurempi. Näin ollen arvokkaamman nahan tuotannossa myös kustannukset ovat suuremmat. Lihava kettu aiheuttaa tarhalla mahdollisesti myös lisätyötä ja -kustannuksia, kun se ei saavuta yhtä todennäköisesti kiimaa muiden kanssa samaan aikaan eikä pysy tiineenä yhtä hyvin

todennäköisyyksin (Kempe ym. 2010). Hedelmällisyys- ja tiineysongelmien takia jalostukseen käytettävien eläinten painoa täytyy saada alemmas ennen siitoskautta. Tutkimuksen (Koskinen ym. 2011) mukaan ketuilla, jotka ovat käyneet läpi painonpudotuksen, on huomattavasti alhaisempi tiinehtyvyys. Huomattavia lisäkustannuksia muodostuu, kun valitaan jalostukseen yksilö, joka ei huonon hedelmällisyyden takia lisäänykään. Aiempien tutkimusten perusteella eläimen hyvinvoinnin kannalta liiallisesta kasvusta on selkeää haittaa. Myös taloudellisesta näkökulmasta lisäkustannukset heikentävät huomattavasti suuremman nahan lisäarvon hyötyä.

2.3. VALKUAISRUOKINTA

Proteiini on rehukomponenteista kallein, joten valkuaisen alentaminen johtaisi merkittäviin kustannussäästöihin (Hernesniemi, 2000). Aiemmissa minkkitutkimuksissa rehuvalkuaisen osuutta on saatu alennettua heikentämättä turkin laatuun (Glem-Hansen, 1980; Työppönen ym. 1986). Rehun komponenttina valkuainen on myös haastavin saada kotimaasta. Aiemmassa tutkimuksessa (Dahlman, 2003) on havaittu normaali turkin ja nahan tuotanto, vaikka rehun valkuaispitoisuus on alennettu 21-22 prosentista 15 prosenttiin, jos rehu täydennetään metioniinilisällä. Valkuaistason ja aminohappojen optimointi on kuitenkin mahdollista vasta kun aminohappotarpeet tiedetään tarkemmin. Rehun optimaalista aminohappokoostumusta on tutkittu muilla tuotantoeläimillä, kuten sioilla ja siipikarjalla (Fuller, 1994; Wang ja Fuller, 1989; Wang ja Fuller 1990; Roth ym., 2001) sekä minkillä (Skrede, 1978; Glem-Hansen, 1980).

2.3.1 VALKUAISEN TARVE JA SULAVUUS

Rehun valkuaisesta saatavia aminohappoja tarvitaan elimistön proteiinisynteesiä varten. Proteiinisynteesissä elimistö muodostaa aminohapoista tarvitsemiaan proteiineja kuten entsyymejä, hormoneja ja elimistön rakennusaineita soluille ja kudoksiin. Sinikettujen valkuaisen tarve perustuu ylläpito tarpeen täyttymisen jälkeen kasvuun ja nahan sekä turkin tuottamiseen.

Tarhaketun sulavuuskokeet ovat perustuneet yleisesti ravintoaineiden kokonaissulavuuteen. Joillakin yksimahaisilla eläinlajeilla, kuten sialla, ohutsuolisulavuuden määrittämisen on havaittu olevan tarkempi menetelmä kokonaissulavuuteen verrattuna etenkin valkuaisen ja aminohappojen osalta, sillä osa aminohapoista ja muista ravintoaineista ohittavat ohutsuolen sulatuksen ja

paksusuolen mikrobien fermentaatio jatkaa sulatusta (Sauer ym. 2000; Hendriks, 2002). Kissojen ja koirien kohdalla on kuitenkin oletettu, että ravintoaineiden sulatus on vähäisempää paksusuolel- sen suhteellisen pienen koon ja alhaisemman kehittymisen takia. Hendriksin (2002) tutkimuksessa paksusuoleen päätyvän ravintoaineen todettiin kuitenkin sulavan mikrobifloran toimesta ja näennäisen kokonaissulavuuden todettiin olevan epätarkka valkuaisen ja aminohappojen sulavuutta määritettäessä. Whilen ym. (2005) tutkimuksessa kokonais- ja ohutsuolisulavuutta vertailtaessa raakavalukuaisen ja aminohappojen sulavuuksissa havaittiin vain pieniä eroja. Valkuaisen ohutsuolisulavuus oli hieman huonompi sen ollessa 81,0 – 86,4 %, kun valkuaisen kokonaissulavuus oli 82,5 – 86,4 % vaihdellen dieetin mukaan. Aminohappojen ohutsuolisulavuus vaihteli 70,1 ja 93,3 % välillä asparagiinin ollessa huonoiten sulava ja arginiinin parhaiten. Pienin kokonaissulavuus määritettiin kysteiinille (72,8%) ja suurin arginiinille (92,2%). Metioniinille määritettiin merkittävästi parempi ohutsuoli- kuin kokonaissulavuus kun taas histidiinille määritettiin merkittävästi huonompi ohutsuoli- kuin kokonaissulavuus.

2.3.2 VALKUAISEN LAATU

Proteiinit ovat polymeerejä, jotka koostuvat toisiinsa peptidisidoksilla kiinnittyneistä aminohapoista. Näitä proteiinien sisältämiä aminohappoja on 20 kappaletta, joista noin kymmenen on määritelty välttämättömiksi aminohapoiksi ja ne on saatava rehusta. Ei-välttämättömiä aminohappoja eläin pystyy tuottamaan itse elimistössään muista aminohapoista transaminaatioissa tai ureasyklissä. Näiden lisäksi on osittain välttämättömiä aminohappoja, joiden valmistamiseen elimistö tarvitsee ravinnon mukana tulevia välttämättömiä aminohappoja (Boisen, 2003; McDonald, 2011).

Rehun valkuaispitoisuutta alennettaessa täytyy huomioida valkuaisen laatu. Rehuvalkuaisen laatuun vaikuttavat aminohappojen määrät sekä niiden keskinäiset suhteet. Valkuaisen laatua kuvataan termillä ihannevalkuainen, jossa eläimen tarpeet huomioon ottaen kaikkien välttämättömien aminohappojen suhteet ovat tasapainossa. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet sioilla ja siipikarjalla lysiinin olevan ensimmäisenä rajoittavana aminohappona ja usein ihannevalkuainen ilmoitetaan kunkin välttämättömän aminohapon osalta suhteellisenä osuutena lysiiniin, jonka tasona pidetään 100 (Boisen ym. 2000; Chung ym. 1992). Eri eläinlajeilla on

erilaiset aminohappotarpeet, minkä takia ihannevalkuainen on määritetty erikseen esimerkiksi sialle ja lihasiipikarjalle sekä osittain siniketulle (Valaja ym. 2005).

Koska metioniini sekä muut rikkiä sisältävät aminohapot edistävät turkkiin tarvittavan keratiinin muodostumista, on niitä pidetty siniketuilla ensimmäisenä turkin kasvua ja laatua rajoittavana aminohappona (Liu ym. 2012). Tutkimukset ovat osoittaneet, että rehun valkuaistasoa alennettaessa kettujen karvan kasvu ja laatu on säilynyt hyvänä, jos rehua on täydennetty metioniinilisällä (Dahlman ym. 2002 ja 2004). Dahlmanin (2003) väitöskirjasta käy ilmi, että rikkiä sisältävien aminohappojen (metioniini ja kysteiini) lisäksi ensimmäisinä rajoittavina aminohappoina ovat treoniini ja histidiini. Tutkimus tehtiin alkuvaiheen kasvatuksessa 9-14 viikon ikäisillä ketuilla. Aminohappojen tarpeet, varsinkin metioniinin ja kysteiinin, voivat muuttua siirryttäessä loppukasvatukseen ja vaiheeseen, jossa ketut kasvattavat talviturkkiaan. Histidiinin vaikutusta sinikettujen valkuaisen hyväksikäyttöön ei ole aikaisemmin tutkittu, minkä takia se valikoitui metioniinin kanssa tähän tutkimukseen.

Tryptofaanin vaikutusta on tutkittu jonkin verran hopeaketulla. Rouvinen ym. (1998) havaitsivat synteettisen tryptofaanilisän parantavan valkuaisen ja kokonaisenergian hyväksikäyttöä. Sen ei havaittu kuitenkaan vaikuttavan kasvuun eikä turkin laatuun tai kokoon. Naarashopeaketuilla sen havaittiin vähentävän pelkoa ja lisäävän uteliaisuutta käytöksessä. Rouvisen mukaan siihen vaikuttaa todennäköisesti naaraan herkkyys niiden aminohappojen epätasapainolle, jotka ovat mukana aivojen serotoniinin synteesissä.

2.3.3 DL-METIONIINI JA L-HISTIDIINI

Metioniinilla on monia fysiologisia tehtäviä elimistössä. Sen lisäksi, että sitä tarvitaan optimaalisen kasvun ja turkin tuotannon takia, sillä on muitakin tehtäviä ravintoaineiden metabolian kannalta. Metioniini osallistuu metylaatioon sekä antioksidanttien aktiivisuuteen. Se vaikuttaa myös solujen toimintaan sekä ravintoaineiden metaboliaan osallistumalla esimerkiksi entsyymien synteesiin (Tesseraud ym., 2009).

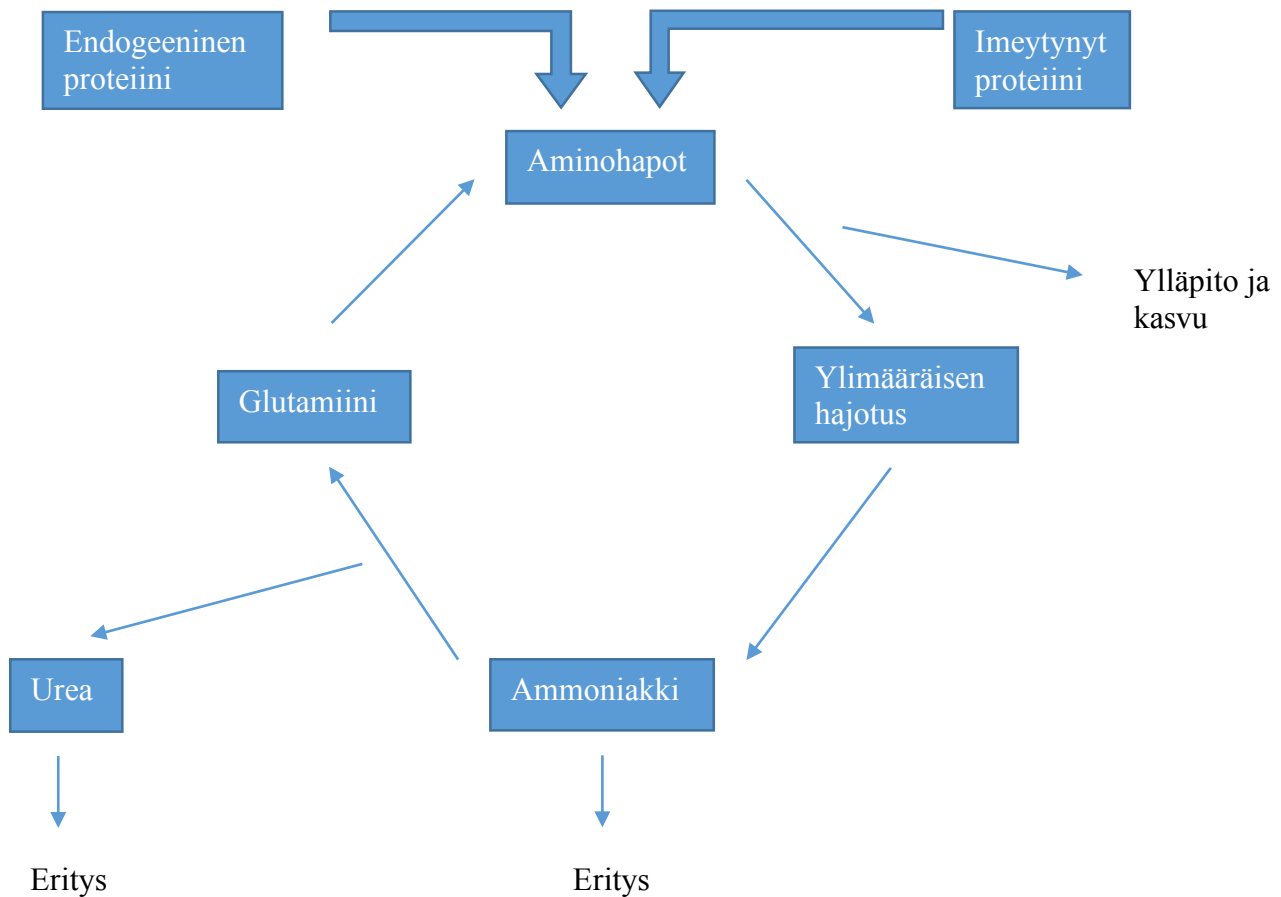
Histidiinin yksi tärkeä tehtävä elimistössä on histamiinin muodostaminen. Histamiini osallistuu välittäjäaineena allergeenien aikaansaamiin reaktioihin (Piva ym., 2002). Histamiini neuronien

aktivoitumisen on havaittu rotilla vähentävän syöntiä ja kehon rasvan määrää (Kasaoka ym., 2004). Histidiinin tiedetään olevan kasvua rajoittava aminohappo ja sen vaikutusta typen pidättymiseen on tutkittu varsinkin sioilla (Heger ym., 2003).

Aminohapot ovat joko L- tai D-muodossa, jotka ovat toistensa isomeerejä. Kaikkia aminohappoja käytetään proteiinisynteesissä L-muodossa. Eläimet voivat hyväksikäyttää myös joidenkin aminohappojen D-muotoja. Metioniiniä käytetään synteettisesti yleisesti raseemisena seoksena DL-muodossa, niin kuin tässäkin tutkimuksessa. D-muodossa olevat aminohapot käyvät kaksivaiheisen reaktion läpi ennen kuin niitä voidaan hyväksikäyttää proteiinisynteesissä. Reaktiossa aminotransferaasi entsyymien avulla D-isomeerista muokataan L-isomeeri. Lysiinillä ja treoniinillä ei ole aminotransferaaseja, joten niiden D-isomeerit eivät ole ravitsemuksellisesti aktiivisia muotoja. Metioniinin D-isomeeri on kaikista aminohapoista tehokkain korvaamaan L-isomeerinsa. D'Mello ja Lewis (1978) ovat kuitenkin havainneet tutkimuksessaan hieman paremman hyödynnettävyyden metioniinin L-muodolle, kuin D- tai DL-muodolle. Eläinlajien välillä on kuitenkin eroja kuinka hyvin ne pystyvät käyttämään aminohappojen D- tai DL-isomeerejä. Esimerkiksi koiralla DL- ja D-metioniinin hyödynnettävyys on 100% L-isomeeriin verrattuna (Baker, 1994). Eri isomeerien sulavuutta on tutkittu ainakin sialla, hiirellä, rotalla ja kanoilla (D'Mello, 2003). Myös siniketulla on verrattu DL- ja L-muotoisen metioniinin sulavuutta, mutta vertaaminen tehtiin kahden eri tutkimuksen välillä. Tuloksena oli, että ne sulatettiin yhtä hyvin (Dahlman ym., 2002). D-histidiinillä on havaittu olevan varsin huono hyväksikäyttöprosentti suhteessa L-isomeeriin, kun kanalla ja hiirellä se oli 10% ja rotalla 0% (Baker, 1994). Tässä tutkimuksessa mikrobien avulla tuotettu histidiini on suoraan proteiinisynteesiin käytettävässä muodossa, L-isomeerinä.

2.3.4 TYPEN ERITYS

Imeytyneestä valkuaisesta sekä muodostuneesta endogeenisestä proteiinista hydrolysoidaan solujen käyttöön aminohappoja, joista elimistö muodostaa proteiinisynteesissä uusia proteiineja kasvuun ja elimistön ylläpitoon. Elimistö ei pysty varastoimaan aminohappoja myöhempää käyttöä varten. Ylimääräiset aminohapot, joita ei käytetä proteiinisynteesiin, hajotetaan ammoniakiksi. Ammoniakki kuljetetaan veressä glutamiinina muiden aminohappojen synteesiä varten tai maksaan, jossa se muokataan ureaksi munuaisten eritettäväksi. (Wright, 1995)



Kuva 2. Typen metabolian ja erittymisen pääpiirteet. (Wright, 1995)

2.4 VALKUAISRUOKINNAN VAIKUTUS YMPÄRISTÖÖN

Pienempi valkuaispitoisuus voi vähentää rehukustannuksia mutta myös tuotannon typpipäästöjä. Aiempien tutkimusten perusteella tiedetään, että pienempi rehun valkuaispitoisuus vähentää eläimen typen eritystä (Dahlman, 2003). Vähemmän valkuaista saavien kettujen kokonaistypen erityis on aiemman tutkimuksen mukaan jopa puolet pienempi runsaasti valkuaista saavien kettujen eritykseen verrattuna (Valaja ym., 2001). Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu myös valkuaisen laadulla olevan merkitystä eritetyn typen määrään. Huonomman valkuaisen laadun havaittiin Buraczewskan (1975) ja Makkinkin (1997) tutkimuksissa nostavan sioilla eritettävän typen määrää. Osa ylimääräisestä proteiinitypeistä muokataan maksassa ureaksi, joka eritetään virtsan mukana ja

osa eritetään orgaanisina typpiyhdisteinä sonnan mukana. Urea hydrolysoituu maaperässä ammoniakiksi ja hiilidioksidiksi (Erisman, 2007).

Typpi on välttämätön ravinne kasvien ja eläinten kasvulle. Ensimmäisenä kasvien kasvua rajoittavana ravintoaineena typpeä on käytetty pitkään kasvintuotannossa lannoitteena. Maailman väestön ja ravinnon tarpeen kasvaessa myös typpilannoitteiden käyttö on kasvanut. Teollisesti tuotetun typpilannoitteen lisäksi tuotantoeläinten typpipitoista lantaa käytetään lannoitteena. Alueilla, joissa typpeä on maaperässä riittävästi, ylimääräinen typpi päätyy ilmakehän typeksi tai muiksi typpipäästöiksi maaperään ja vesistöihin. Typpipäästöistä noin 65 prosenttia on maataloudesta, ja tästä suurin osa on eläintuotannosta. Eläintuotannon typpipäästöt tulevat eläinsuojista ja pelloille levitettävästä lannasta (Erisman, 2007). Lannan typpi aiheuttaa merkittävimmän osuuden päästöistä aiheuttaen rehevöitymistä ja happamoitumista (Luostarinen ym., 2011). Happamoitumista aiheuttaa enimmäkseen lannasta haihtuva ammoniakki. Turkistuotannon ammoniakkipäästöt vastaavat 1,3 prosenttia Suomen kaikista happamoittavista päästöistä. MTT:n tekemän raportin mukaan turkistuotantoketjulla on myös vesistöjä rehevöittäviä ravinnepäästöjä vähentävä vaikutus. Ketunrehussa käytettävän kalan mukana poistuu ravinteita nelinkertainen määrä suhteessa ketunnahan elinkaaren ravinnepäästöihin. Laskelmassa on mukana typen lisäksi fosfori. Silakan mukana Itämerestä poistuu 1,4 prosenttia typen kokonaiskuormituksista Suomessa. Turkistuotannon osuus Suomen typpikuormasta on Maa- ja metsätalousministeriön mukaan 0,6 prosenttia. (Silvenius ym., 2011)

Eläinten lannan typpiyhdisteet päätyvät maaperään ammoniakkina, joka muutetaan ammoniumioneiksi. Ammoniumionit hapettuvat nitrifikaatiossa nitriitiksi ja nitraatiksi. Nitraatti on tunnettu pohjaveden saastuttaja. Suomessa on useampi turkistarha pohjavesialueella, mikä aiheuttaa suuren riskin niiden saastumiselle (Martin ym., 2009). Vähähappisissa olosuhteissa nitrifikaatiossa muodostuu myös maapalloa voimakkaasti lämmittävää kasvihuonekaasua, dityppioksidia N_2O . Denitrifikaatiossa nitraatista muodostuu molekulaarista typpeä N_2 ilmakehään.

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tarkentaa valkuaisen ja aminohappojen tarvetta kasvavilla siniketuilla. Tutkimuksessa selvitettiin pienempien valkuaisosojen sekä metioniini- ja histidiinilisän vaikutusta kasvavien sinikettujen valkuaisen hyväksikäyttöön typpitasemenetelmällä. Tavoitteena oli sen lisäksi selvittää eri valkuaisosojen vaikutusta muidenkin ravintoaineiden sulavuuteen, aminohappojen kokonais- ja ohutsuolisulavuuteen sekä plasman aminohappo- ja ureapitoisuuksiin. Rehuvalkuaisen korkean hinnan sekä saannin rajallisuuden takia tavoitteena on rehun valkuaispitoisuuden optimointi, jolloin rehukustannuksia saataisiin alennettua sekä typen eritystä ympäristöön vähennettyä.

Tutkimuksen hypoteesit ovat:

- siniketun rehun valkuaispitoisuutta voidaan alentaa ilman negatiivista vaikutusta ravintoaineiden sulavuuteen loppukasvatuksen aikana
- erittyneen typen määrä laskee, kun rehun valkuaispitoisuutta alennetaan.

4 AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 KOEAIKA- JA PAIKKA

Tutkimus suoritettiin vuoden 2016 loppukasvatuksen aikana lokakuussa Luova Oy:n tiloissa Kannuksessa, Keski-Pohjanmaalla. Koe kesti noin viikon 21.10-28.10, joista ensimmäiset neljä päivää käsitteli totuttelujakson koerehuun ja seuraavat neljä päivää keruujakson.

4.2 KOEJÄRJESTELYT JA -ELÄIMET

Tutkimus toteutettiin jatkuvan kokeen mallilla, johon valittiin 20 urossinikettua. Koe suoritettiin makroravintoaineiden osalta kokonaissulavuutena ja aminohappojen sulavuus määritettiin näennäisenä ohutsuoli- sekä kokonaissulavuutena. Sulavuuskoe käsitteli viisi erilaista rehukäsittelyä, joihin kuhunkin valittiin neljä eläintä. Eläimet punnittiin ennen kokeiden alkua, jolloin saatiin muodostettua mahdollisimman tasavertaiset ryhmät. Kokeeseen valitut urosketut olivat kokeen aikana 23 viikon ikäisiä. Kettujen keskimääräinen elopaino kokeen alussa oli 15,40 kilogrammaa.

Kaikki ketut olivat koko kokeen ajan samassa tilassa omissa metaboliahäkeissään. Metaboliahäkit olivat hieman alle 1 m² kokoisia ja ne olivat noin metrin korkeudella lattiasta. Häkin pohja oli isosilmäistä verkkoa, joka esti eläimiä likaantumasta. Pohjaverkon alla oli tiheämpää verkkoa oleva ritilä, johon sonta jäi kerättäväksi. Tiheämmän verkon alla oli kiinteä muovipohja, joka muodosti suppilon. Tilana toimi umpinainen rakennus varjotalojen sijaan. Rakennuksessa oli pieni lämmitys ja ulko-ovi pidettiin päivisin auki paremman ilmanvaihdon ja valaistuksen tarjoamiseksi.

Ennen tutkimuksen alkua ketut olivat normaaleissa tarhaolosuhteissa kyseisellä tutkimustarhalla ja saivat samaa rehua tarhan muiden eläinten kanssa. Kokeiden alkaessa ketut siirrettiin metaboliahäkkeihin ja rehukäsittely valittiin satunnaisesti kullekin viidelle ryhmälle. Jokainen neljän ketun ryhmä sai samaa rehua koko kokeen ajan.

4.3 REHUT JA RUOKINTA

Käsittelyt olivat seuraavat:

- 1) P24: Sulavan raakavalkuaisen osuus ME:stä 24%
- 2) P20: Sulavan raakavalkuaisen osuus ME:stä 20%
- 3) P20M: Sulavan raakavalkuaisen osuus ME:stä 20% + 0,1 (%/KA) metioniinilisä
- 4) P16M: Sulavan raakavalkuaisen osuus ME:stä 16% + 0,1 (%/KA) metioniinilisä
- 5) P16MH: Sulavan raakavalkuaisen osuus ME:stä 16% + 0,1 (%/KA) metioniini- ja 0,1 (%/KA) histidiinilisä

Koerehujen raaka-aineina käytettiin yleisesti rehunvalmistukseen käytettyjä raaka-aineita. Rehun valkuainen oli suurimmaksi osaksi peräisin broilerin teurassivutuotteista, kalajauhosta sekä tuoreesta kalasta. Kaikki viisi käsittelyä pohjautuivat samoihin raaka-aineisiin ja niiden tarkemman koostumuksen on esitetty taulukossa 1. Vähemmän valkuaista sisältävien käsittelyiden valkuaista korvattiin täykkelyksellä ja vehnäleseellä. Rasvan määrää nostettiin hieman enemmän käsittelyissä, joissa valkuaisen osuus oli vain 16 prosenttia ME:stä.

Taulukko 1.

Rehujen raaka-ainekoostumus (% KA:sta)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH
Silakka	4.0	3.3	3.3	2.5	2.5
Teurassivutuote, sika	0.8	0.7	0.7	0.5	0.5
Teurassivutuote, broileri	8.3	6.8	6.8	5.3	5.3
Ohra, esikypsennetty	14.9	12.2	12.2	9.4	9.4
Käsitelty eläinvalkuainen	2.0	1.4	1.4	1.0	1.0
Kalajauho	3.4	2.7	2.7	2.2	2.2
Melassileike	1.8	2.3	2.3	2.3	2.3
Vehnänlese	1.7	2.2	2.2	2.3	2.3
Ketunrasva	5.6	5.8	5.8	7.5	7.5
Kivennäinen	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vehnätärkkelys, kypsytetty	0.0	4.9	4.9	7.1	7.1
DL-metioniini	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
L-histidiini	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1

P24: Kärittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 24%, P20: Kärittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20%, P20M: Kärittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20% + metioniinilisä, P16M: Kärittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniinilisä, P16MH: Kärittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniini- ja histidiinilisä.

Rehujen metioniinitaso pyrittiin nostamaan käsittelyissä P20M, P16M ja P16MH kontrollirehun (P24) tasolle synteettisen DL-metioniinin avulla. Kärittelyn P16MH histidiinitaso pyrittiin nostamaan synteettisen L-histidiinin avulla myös lähelle kontrollirehun tasoa.

Taulukko 2.

Rehujen laskennallinen ravintoainekoostumus (g / kg KA) ja energian jakautuminen

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH
Kuiva-aine					
Tuhka	68.3	58.2	58.1	49.9	49.8
RV	291	248	249	212	214
RR	277	258	257	285	284
RH	363	453	453	479	478
Energian jakautuminen (%)					
Proteiini	24	20	20.1	16	16.2
Rasva	55	50.7	50.7	53.3	53.1
Hiilihydraatit	21	29.3	29.3	30.7	30.6

P24: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 24%, P20: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20%, P20M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20% + metioniinilisä, P16M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniinilisä, P16MH: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniini- ja histidiinilisä.

Taulukko 3.

Rehujen laskennallinen aminohappokoostumus (g / kg KA)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH
Metioniini	5.90	4.90	6.00	5.90	5.90
Histidiini	7.00	5.90	5.90	4.90	7.10
Lysiini	17.60	14.50	14.50	12.00	12.00
Kysteiini	3.50	2.90	2.90	2.50	2.50
Treoniini	11.90	9.90	9.90	8.20	8.20
Tryptofaani	3.70	3.10	3.00	2.50	2.50
Isoleusiini	11.50	9.50	9.50	7.90	7.90
Leusiini	21.10	17.50	17.50	14.40	14.40
Valiini	14.00	11.60	11.60	9.70	9.60
Fenyylialaniini	14,50	12.00	12.00	9.90	9.90
Tyrosiini	8.00	6.50	6.50	5.40	5.40
Arginiini	18.80	15.50	15.50	12.80	12.70
Alaniini	14.60	12.10	12.00	10.00	10.00
Asparagiini	23.70	19.60	19.60	16.20	16.20
Glutamiini	37.30	31.10	31.00	25.80	25.80
Glysiini	23.80	19.50	19.40	15.90	15.90
Prolini	17.60	14.50	14.50	11.90	11.90
Seriini	13.20	10.90	10.80	9.00	8.90
Yhteensä	267.70	221.50	222.10	184.90	186.80

P24: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 24%, P20: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20%, P20M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20% + metioniinilisä, P16M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniinilisä, P16MH: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniini- ja histidiinilisä.

Ennen kokeiden alkua koerehua sulatettiin 30 - 33 kg jokaista ryhmää varten ja merkkiainetta lisättiin 260 – 270 g ryhmien kokonaisrehumäärään. Celiten osuus oli siis noin 0,8 % rehun tuorepainosta. Kun merkkiaine oli lisätty, rehut jaettiin päiväannoksiin, jotka määräytyivät rehun kuiva-aine (ka) pitoisuuden mukaan niin, että koeryhmät saivat keskenään saman määrän kuiva-ainetta, noin 297g/pv.

Ketut olivat koko kokeen ajan annosruokinnalla ja jokaisen koeryhmän syöntimäärä pidettiin samana. Kettukohtaiset päivittäiset rehuannokset punnittiin uudestaan jakamisen yhteydessä ja koko annos jaettiin kerran päivässä mahdollisimman samaan kellonaikaan. Totutusjakson aikana jokainen kettu sai rehua noin 800 g/pv.

4.4 NÄYTTEIDEN KERUU JA KÄSITTELY

Jokaiselta keruupäivältä pakastettiin jokaista käsittelyrehua noin 100g näyte kuiva-aineanalyysiä varten. Yksilöhäkkien suurempisilmäisen verkon alla pidettiin sonnan keruuta varten tiheäsilmaisempää verkkoa, jotta saatiin eroteltua sonta ja virtsa. Virtsa valui ritilän ja verkon läpi keruupohjan suppiloa pitkin pulloon. Jokaisella ketulla oli yksi keruuastia sonnalle ja yksi virtsalle, jotka säilytettiin pakastehuoneessa laboratorioanalyysiin asti. Näytteet kuljetettiin jäisinä ja laboratorioanalyysit toteutettiin pääosin Helsingin yliopiston Kotieläintieteen laboratoriossa. Raakasva (HCl) analyysit määritettiin FurLab:lla Vaasassa ja plasman urea Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan laboratoriossa.

4.4.1 VIRTSANÄYTTEET

Keruuhäkin pohjassa olevaan virtsa-astiaan lisättiin kokeen alussa 10ml rikkihappoa neljä millilitraa typen haihtumisen estämiseksi. Virtsan pH:ta mitattiin pH-paperin avulla ja se pyrittiin pitämään alle kolmessa koko keruujakson ajan lisäämällä neljä millilitraa rikkihappoa kerrallaan. Virtsan keruuastiat tyhjennettiin isompiin kettukohtaisiin kannellisiin astioihin kerran päivässä tai jos niiden huomattiin olevan täynnä. Keruujakson päätyttyä koko keruujakson aikana kertynyt virtsa punnittiin, sekoitettiin huolellisesti ja niistä otettiin näytteet typen ja urean määrittämistä varten Helsingin yliopiston laboratorioon Viikkiin sekä Vaasan FurLab:iin. Virtsan kokonaistypen määrittäminen tehtiin Kjeldahl-menetelmällä (AOAC 1995), jossa käytettiin Tecator –polttolaitetta (FOSS Tecator Digestion Auto, FOSS Tecator Scrubber) sekä tislauksen- ja titrauslaitteistoa (FOSS Kjeltex Auto 2300, Foss, Hillerod, Tanska). Urea määritettiin liquicolor Human – kitillä ja mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzun UV mini 1240).

4.4.2 SONTANÄYTTEET

Keruuhäkkien ritilät tyhjennettiin päivittäin huolellisesti sonnasta ja kerättiin suoraan kannellisiin kettukohtaisiin astioihin, jotka säilytettiin pakastehuoneessa. Keruujakson aikana kertynyt sonta sekoitettiin viimeisen keruupäivän jälkeen huolellisesti tehosekoittimen avulla, jotta niistä saatiin mahdollisimman homogeeniset näytteet analyysijä varten.

Ennen analyysijä pakastetut sontanäytteet sulatettiin ja tuoreista näytteistä määritettiin primäärinen kuiva-aine. Noin 20 gramman näytteitä kuivatettiin 100 °C asteisessa uunissa 20 tunnin ajan. Tuoreesta näytteestä analysoitiin Kjeldahl menetelmällä sonnan typpi, josta määritettiin raakavalkuainen kertomalla kokonaistypen määrä kertoimella 6,25. Analyysinäytteitä varten sonta kylmäkuivattiin ja jauhettiin huumareella, jonka jälkeen näytteestä analysoitiin tuhka, aminohapot ja merkkiaine.

Orgaaninen aine (OA) määritettiin standardianalyysien mukaan (AOAC 1990) tuhkaamalla näytteet 600 °C:ssa uunissa kahden tunnin ajan. Sontanäytteiden aminohappojen määrittämiseksi näytteet hydrolysoitiin ensin direktiivin 98/64/EC mukaisesti (European Commission, 1998). Aminohappojen konsentraatiot määritettiin hydrolysoiduista näytteistä UPLC-laitteella (Waters Acquite UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat) ja käytössä oli BEH C18 kolonni (100 x 2,1mm). Raakasva määritettiin Weibull-Stoldt'n menetelmällä, jossa näyte ensin hydrolysoitiin vetykloridilla, jonka jälkeen rasva uutettiin petroolieetterillä Soxhletin mukaisesti FurLabissa (BüCHI Hydrolysis Unit B-411 ja BüCHI Extration Unit B-811).

4.4.3 OHUTSUOLINÄYTTEET

Eläimet lopetettiin kokeen loputtua ohutsuolinäytteiden saamiseksi. Lopetus tapahtui hiilidioksidilla ja eläimet lopetettiin pareittain. Vatsaontelo avattiin ja suolinippu levitettiin auki. Ohutsuoli katkaistiin kahteen osaan mahalaukun ja umpisuolen väliltä. Ohutsuolinäyte kerättiin ohutsuolen viimeisestä kolmanneksesta myöhempää aminohappoanalyysiä varten. Ruokasulanäytteet pakastettiin välittömästi. Ohutsuolinäytteet kylmäkuivattiin pakastekuivurissa ja niistä määritettiin primäärinen kuiva-aine, merkkiaine ja aminohapot. Aminohapot määritettiin hydrolysoiduista näytteistä UPLC-laitteella (Waters Acquite UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat) ja käytössä oli BEH C18 kolonni (100 x 2,1mm).

4.4.4 REHUNÄYTTEET

Keruuajaksolla kaikista rehuista otettiin ruokinnan yhteydessä näyte rehun kemiallisen koostumuksen analysointia varten. Syömätön rehu kerättiin ennen seuraavaa ruokintaa, punnittiin ja pakastettiin eläinkohtaisiin astioihin, mistä määritettiin yksi kuiva-aine. Keruukauden aikana

kerätyistä rehunäytteistä muodostettiin analyysinäytteet, joista määritettiin kuiva-ainepitoisuus, raakavalkuainen, raakarasva, hiilihydraatti ja tuhka. Analyysit tehtiin samoilla menetelmillä kuin sontanäytteistä.

4.4.5 VERINÄYTTEET

Verinäytteet kerättiin vain kerran kokeen aikana, jolloin välttyttiin eläimille aiheutuvalta ylimääräiseltä stressiltä. Yhdet näytteet riittivät vertaamaan eri käsittelyissä olevien eläinten veren aminohappo- ja ureapitoisuuksia. Paastoverinäytteet otettiin jokaiselta ketulta tassun laskimosta lopetusta edeltävänä päivänä. Verta kerättiin riittävä määrä analyysejä varten 10 ml EDTA-putkeen. Verinäytteet sekoitettiin välittömästi käsin putkea käännellen ja asetettiin jäällä varustettuun kylmälaukkuun. Putket sentrifugoitiin keruun päätyttyä 10 minuutin ajan 1000-1300 G nopeudella. Erottunutta veriplasmaa pipetoitiin ensin 0,5 ml eppendorf-putkiin, jotka pakastettiin (-20°C) välittömästi ureamääritystä varten. Urea määritettiin Viikin laboratoriossa samalla menetelmällä kuin virtsanäytteiden urea.

Aminohappoanalyysiä varten pipetoitiin 0,2 millilitraa plasmanäytettä ja 0,2 millilitraa Kotieläintieteen laboratoriossa valmistettua SSA/Nva reagenssia (10% sulfosalisylihappoa, jossa 250 mikromoolia norvaliinia) eppendorf-putkeen. Näyte sekoitettiin ja sentrifugoitiin 15000 G nopeudella viiden minuutin ajan. Valmistuneesta supernatantista pipetoitiin 0,1 ml näytteet, jotka pakastettiin välittömästi. Plasman aminohapot analysoitiin pakastetuista näytteistä nestekromatografilla (Waters Acquity UPLC, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat) ja kolonnilla (186004097, Waters MassTrak AAA, Waters, Milford, MA, Yhdysvallat).

4.5 TULOSTEN LASKEMINEN JA TILASTOLLISET ANALYYSIT

Tutkimuksen ravintoaineiden sulavuus määritettiin näennäisenä kokonaissulavuutena, jolloin sonta sisältää rehusta peräisin olevien ravintoaineiden lisäksi elimistöstä peräisin olevaa endogeenistä ainesta. Aminohappojen sulavuus määritettiin näennäisenä kokonaissulavuutena sekä näennäisenä ohutsuolisulavuutena, jolloin mukaan tulee myös elimistössä – mahalaukussa ja ohutsuolessa - erittyvää endogeenistä ainesta.

Kuiva-aineen ja ravintoaineiden kokonaissulavuudet laskettiin syödyn ravintoaineen ja sonnan tai virtsan mukana eritetyn ravintoaineen erotuksena seuraavasti:

$$\text{Ravintoaineen sulavuus \%} = (\text{Syöty ravintoaine} - \text{Eritetty ravintoaine}) / \text{Syöty ravintoaine} \times 100$$

AIA merkkiainemenetelmällä määritetyt aminohappojen sulavuudet laskettiin rehun merkkiaineen konsentraation ja sulamattoman aineksen merkkiaine konsentraation erotuksena seuraavasti:

$$\text{Ravintoaineen sulavuus \%} = 1 - (\text{Mr} / \text{Ms}) \times (\text{Nr} / \text{Ns}) \times 100,$$

missä Mr = merkkiaineen pitoisuus (g/kg ka) rehussa, Ms = merkkiaineen pitoisuus (g/kg ka) sulamattomassa aineessa, Nr = ravintoaineen pitoisuus (g/kg ka) rehussa ja Ns = ravintoaineen pitoisuus (g/kg ka) sulamattomassa aineessa.

Raakavalkuainen sisältää typpeä yleisesti keskimäärin 16 prosenttia, jolloin typpimäärän kertoimeksi saadaan $100 / 16 = 6,25$, jonka avulla saadaan raakavalkuaisen määrä laskettua seuraavasti:

$$\text{Rehun tai ulosteiden sisältämä typpi (g)} \times 6,25 = \text{Rehun tai ulosteiden sisältämä raakavalkuainen (g)}$$

Typpitase laskettiin saannin ja erityksen erotuksena seuraavasti:

$$\text{Rehusta saatu typpi (g/pv)} - (\text{Typen erityys virtsassa (g/pv)} + \text{typen erityys sonnassa (g/pv)}).$$

Typen osuus ureassa on $28 \text{ (g/mol)} / 60 \text{ (g/mol)} = 0,467$, jonka avulla urean N laskettiin.

Rehun energiajakauma on laskettu kokonaiskeruumenetelmällä saatujen sulavuuskerrointen mukaan seuraavilla kaavoilla (Hansen et al. 1990):

$$\text{SRV \% of ME} = \text{SRV} \times 4.5 / ((\text{SRV} \times 4.5) + (\text{SRR} \times 9.5) + (\text{SHH} \times 4.2)) \times 100$$

$$\text{SRR \% of ME} = \text{SRR} \times 9.5 / ((\text{SRV} \times 4.5) + (\text{SRR} \times 9.5) + (\text{SHH} \times 4.2)) \times 100$$

$$\text{SHH \% of ME} = \text{SHH} \times 4.2 / ((\text{SRV} \times 4.5) + (\text{SRR} \times 9.5) + (\text{SHH} \times 4.2)) \times 100,$$

joissa SRV = sulava raakavalkuainen, SRR = sulava raakarasva, SHH = sulava raakahiilihydraatti.

Tutkimuksen tulosten tallentamiseen ja laskemiseen käytettiin Microsoft Excel 2010 – ohjelmaa. Tilastollinen analyysi suoritettiin SAS ohjelman versiolla 9.4. GLM-proseduurilla ja jakauman normaalisuus testattiin Barlett's testillä. Käsittelyjen väliset tilastolliset erot testattiin kontrasteilla, jotka valittiin seuraavasti:

C1: Kontrolli (P24) verrattuna muut käsittelyt

C2: Valkuaistasojen testaus; P20 (2 ja 3) käsittelyt verrattuna P16 (4 ja 5) käsittelyt

C3: Metioniinin testaus; P20 verrattuna P20 + metioniini

C4: Histidiinin testaus; P16M verrattuna P16M + histidiini

Käsittelyiden välisiä tilastollisia eroja tarkasteltiin seuraavasti:

Erittäin merkitsevä ero *** = $p < 0,001$

Hyvin merkitsevä ero ** = $p < 0,01$

Merkitsevä ero * = $p < 0,05$ (riski sattumalle alle 5%, eli tilastollisesti merkitsevä)

Suuntaa antava ero O = $p < 0,1$ (riski sattumalle voi olla 5-10%)

5 TULOKSET

5.1 REHUJEN KEMIALLINEN KOOSTUMUS

Koerehut maistuivat eläimille hyvin, eikä syömätöntä rehua tarvinnut kerätä ja analysoida. Rehuanalyysissä saatu kemiallinen koostumus on esitetty taulukossa 4. Kaikissa käsittelyissä metabolisen energian (ME) määrä oli samaa luokkaa (18,2 – 19,5 MJ/kg KA). Raakavalkuaisen määrä vaihteli käsittelyn P16MH 207 g ja kontrollin 278 g välillä. Valkuaispitoisuuden vaihtelu saatiin aikaan vähentämällä valkuaislähteitä, joita olivat teurassivutuotteet, silakka ja kalajauho. Vähentynyt valkuaismäärä korvattiin suuremmalla hiilihydraatin määrällä. Käsittelyssä P20M oli pienin hiilihydraatin määrä sen ollessa 358 g ja suurin hiilihydraatin määrä oli käsittelyssä P16MH, 469 g. Hiilihydraatin määrää saatiin nostettua vehnätärkkelyksellä ja vehnänleseellä. Rehujen rasvapitoisuus vaihteli 257 ja 321 gramman välillä. Käsittelyn P20M rasvan määrä oli huomattavasti suurempi, minkä takia kyseisen käsittelyn ME:n määrä oli myös suurin. Rasvan ja hiilihydraatin välinen suhde oli huomattavasti suurempi P20 käsittelyissä kuin P16 käsittelyissä.

Taulukko 4.
Rehujen kemiallinen koostumus (g/kg KA)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH
Kuiva-aine	397.5	371.4	361.1	370.9	370.6
Raakavalkuainen	277.6	246.1	241.9	228.7	206.6
Raakarasva	256.4	300.3	320.7	273.5	254.4
Hiilihydraatti	383.9	374.7	358.3	423.8	469.1
Tuhka	82.1	78.9	79.1	74	69.9
ME MJ/kg KA	18.2	18.9	19.5	19.0	18.4
Syönnin määrä/ pv kuiva-ainetta	297	297	297	297	297
Energian jakautuminen (%)					
Proteiini	21.5	17.5	15.9	16.0	13.6
Rasva	52.3	59.2	61.7	54.8	51.3
Hiilihydraatti	26.2	23.3	22.4	29.2	35.1
Rasva:Hiilihydraatti	2.0	2.5	2.8	1.9	1.5

P24: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 24%, P20: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20%, P20M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20% + metioniinilisä, P16M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniinilisä, P16MH: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniini- ja histidiinilisä.

Käsittelyiden energian jakautuminen ei toteutunut aivan suunnitellun mukaisesti (vertaa: Laskennallinen koostumus taulukko 2.). Rasvan osuus ME:stä käsittelyssä P20M oli noin 62 prosenttia, kun kontrollikäsittelyssä se oli noin 52 prosenttia. Toteutunut energian osuus raakavalkuaisesta oli P20M käsittelyssä jopa pienempi kuin P16M käsittelyssä (15,9 ja 16,0 %). Kaikissa käsittelyissä, lukuun ottamatta P16M:ssä, proteiinin osuus ME:stä oli pienempi kuin suunniteltiin. Rasvan osuus ME:stä olisi pitänyt olla P16 käsittelyissä suurempi, pienemmän proteiini osuuden takia, mutta olikin pienempi kuin P20 käsittelyissä. Hiilihydraateista saatu energia oli kuitenkin suurempi P16 käsittelyissä, jolloin näidenkin rehujen energiamäärä saatiin samalle tasolle muiden käsittelyiden kanssa.

Taulukko 5.

Rehujen aminohappokoostumus (g / kg KA)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH
Metioniini	5.11	3.98	6.35	7.10	6.89
Histidiini	6.32	5.22	5.29	5.19	5.57
Lysiini	15.29	14.23	14.11	14.00	11.84
Kysteiini	3.78	2.73	3.31	3.60	2.67
Treoniini	10.79	9.70	9.85	9.39	8.32
Tryptofaani	1.90	1.74	1.66	1.54	1.50
Isoleusiini	10.19	9.48	9.76	9.05	8.22
Leusiini	20.58	17.80	18.01	17.35	15.09
Valiini	14.72	12.78	12.92	12.49	10.83
Fenyyialaniini	11.88	9.99	10.34	9.73	8.74
Tyrosiini	7.87	6.83	7.32	6.68	6.07
Arginiini	16.87	14.58	15.09	14.20	12.59
Alaniini	16.36	14.22	14.32	13.96	11.90
Asparagiini	22.41	20.11	20.19	19.84	16.93
Glutamiini	38.23	34.46	34.31	32.91	28.67
Glysiini	20.26	16.90	17.21	16.56	14.46
Prolini	17.15	14.61	14.51	14.04	11.96
Seriini	13.43	11.75	11.95	11.42	10.02
Yhteensä	253.13	221.11	226.50	219.04	192.28

P24: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 24%, P20: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20%, P20M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 20% + metioniinilisä, P16M: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniinilisä, P16MH: Käsittely, jossa valkuaisen osuus ME:stä 16% + metioniini- ja histidiinilisä.

Rehuanalyyssissä saatu aminohappokoostumus näkyy taulukossa 5. Taulukosta nähdään aminohappojen määrän (g/kg KA) vaihtelu valkuaispitoisuuden mukaan. Kontrollissa aminohappojen kokonaismäärä on huomattavasti suurin. Käsittelyn P20M rehu sisälsi enemmän aminohappoja kuin muut käsittelyrehut, kontrollia lukuun ottamatta.

Synteettisen metioniinin avulla koeryhmien P20M, P16M ja P16MH metioniinipitoisuus saatiin korkeammaksi kuin kontrollirehun metioniinipitoisuus. Histidiinipitoisuus laski valkuaispitoisuuden laskiessa, mutta koeryhmän P16MH histidiinipitoisuutta saatiin nostettua synteettisellä aminohappolisällä vain hieman lähemmäs kontrollin histidiinipitoisuutta. Histidiinin kohdalla ero jäi turhan pieneksi, kun tutkitaan histidiinin vaikutusta. Määrä jäi pienemmäksi kuin kontrollikäsittelyn

ja erot muihinkin käsittelyihin ovat hyvin pieniä. Lysiinin määrä laski lineaarisesti laskevan valkuaispitoisuuden kanssa.

5.2 RAVINTOAINEIDEN SULAVUUS

Rehujen koostumuksen muutos ei vaikuttanut eläinten syöntiin. Kaikissa käsittelyissä eläimet söivät totutusjakson päätyttyä kaiken tarjotun rehun ja syödyn kuiva-aineen määrä pysyi kokeen ajan samana. Kaikkien ravintoaineiden sulavuus oli hyvä ja suuria vaihteluita ei nähty.

Taulukko 6.

Ravintoaineiden kokonaissulavuus (%)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH	SEM	C1	C2	C3	C4
Kuiva-aine	73.91	73.64	73.88	74.57	76.08	0.896	0.536	O	0.853	0.252
Raakavalkuainen	75.63	73.46	70.50	71.75	66.51	2.689	0.112	0.306	0.447	0.189
Raakarasva	94.44	95.83	95.95	95.95	94.77	0.297	**	O	0.767	*
Hiilihydraatti	71.59	68.48	70.31	74.47	79.55	1.864	0.452	***	0.497	O

C1: kontrolli vs. Muut, C2: proteiinitasojen vertailu, P16 vs. P20, C3: metioniinilisän vaikutus, P20 vs. P20M, C4: histidiinilisän vaikutus P16M vs. P16MH. SEM=keskiarvon keskivirhe.

* Merkitsevyystaso $p < 0,05$.

** Merkitsevyystaso $p < 0,01$.

*** Merkitsevyystaso $p < 0,001$.

O Suuntaa-antavasti merkitsevä $p < 0,1$.

Valkuaisen sulavuus huononi valkuaispitoisuuden laskiessa, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi. Suurin sulavuus oli kuitenkin kontrollirehussa (75,6 %), jossa valkuaisen pitoisuuskin oli suurin (277,6g) ja pienin P16MH käsittelyssä (66,5 %), jossa valkuaisen määrä oli pienin (206,6g). Huomioitavaa on, että ero valkuaisen sulavuudessa oli siis melkein 10 prosenttia vaikkakaan se ei tilastollisesti ollut merkitsevä. Kuiva-aineen sekä hiilihydraatin sulavuudet olivat paremmat käsittelyissä P16 ja huonoimmat P20 käsittelyissä. Hiilihydraatin sulavuus erosi P16 ja P20 käsittelyiden välillä tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,001$). Käsittelyssä P16MH hiilihydraatin sulavuus oli noin viisi prosenttia parempi ($p < 0,1$) kuin käsittelyssä P16M. Käsittelyssä 16MH hiilihydraattia oli 469,1 g ja käsittelyssä 16M sitä oli 423,8 g. Raakarasvan sulavuus oli huonoin kontrollirehussa ja ero oli tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,01$) verrattuna muihin käsittelyihin. Ryhmien P16 raakarasvan sulavuus erosi tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,05$) toisistaan, ollen käsittelyssä P16M kuitenkin vain

noin yhden prosentin parempi kuin P16MH käsittelyssä. Rasvan sulavuus erosi enimmillään 1,5 prosenttia kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä, mutta oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,01$). Rasvan määrä oli käsittelyssä P16M noin 20g suurempi, kuin P16MH käsittelyssä.

5.3 AMINOHAPPOJEN SULAVUUS

Käsittelyiden yhteenlaskettu aminohappojen ohutsuolisulavuuksien keskiarvo säilyi hyvin samanlaisena valkuaispitoisuuden laskiessa, vaihdellen 73,0% ja 73,8 % välillä, eikä siinä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (Taulukko 7.). Tilastollisesti merkitseviä eroja havaittiin lysiinin, kysteiinin, tryptofaanin, histidiinin, metioniinin ja proliinin sulavuuksissa, mutta muiden aminohappojen kohdalla rehun pienemmällä valkuaispitoisuudella tai lisätyllä metioniinilla ja histidiinilla ei ollut merkitsevää vaikutusta aminohappojen ohutsuolisulavuuteen.

Taulukko 7. Aminohappojen ohutsuolisulavuus (%)

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH	SEM	C1	C2	C3	C4
Metioniini	86.6	84.2	90.4	90.3	91.6	1.020	*	**	***	0.402
Histiidiini	77.0	77.6	78.5	77.9	82.2	1.391	0.206	0.167	0.652	*
Lysiini	81.5	83.7	84.9	84.7	83.8	1.162	*	0.986	0.486	0.592
Kysteiini	37.2	14.6	32.4	42.0	23.8	4.844	0.118	O	*	*
Treoniini	67.6	65.4	66.1	63.2	63.8	2.067	0.217	0.297	0.803	0.852
Tryptofaani	63.7	60.3	61.5	54.5	57.9	2.346	O	O	0.730	0.323
Isoleusiini	75.9	75.2	75.5	73.3	75.6	1.375	0.521	0.516	0.885	0.257
Leusiini	76.1	76.4	77.0	76.0	76.7	1.278	0.747	0.766	0.752	0.723
Valiini	72.4	72.0	72.1	71.0	71.8	1.508	0.699	0.659	0.961	0.717
Fenyyialaniini	75.5	74.6	76.3	75.2	75.8	1.416	0.987	0.991	0.414	0.784
Arginiini	77.7	77.1	77.7	77.9	77.6	1.096	0.942	0.732	0.713	0.862
Ei-välttämättömät										
Tyrosiini	75.7	73.3	75.2	74.7	77.2	1.650	0.757	0.323	0.432	0.309
Alaniini	76.8	77.5	77.4	77.4	76.0	1.103	0.840	0.530	0.957	0.405
Asparagiini	63.8	63.9	64.9	63.1	65.3	2.212	0.853	0.928	0.742	0.480
Glutamiini	77.7	77.3	77.1	76.7	77.2	1.355	0.707	0.841	0.897	0.803
Glysiini	68.8	67.4	67.7	67.9	67.1	1.522	0.449	0.955	0.911	0.704
Proliini	66.6	64.2	63.6	63.2	61.2	1.768	O	0.357	0.822	0.445
Seriini	62.6	60.1	60.2	57.4	58.9	2.214	0.185	0.382	0.984	0.629
Total	73.6	73.0	73.8	73.0	73.6	1.419	0.849	0.952	0.709	0.791

C1: kontrolli vs. Muut, C2: proteiinitasojen vertailu, P16 vs. P20, C3: metioniinilisän vaikutus, P20 vs. P20M, C4: histidiinilisän vaikutus, P16M vs. P16MH. SEM=keskiarvon keskivirhe.

* Merkitsevyytaso $p < 0,05$.

** Merkitsevyytaso $p < 0,01$.

*** Merkitsevyytaso $p < 0,001$.

O Suuntaa-antavasti merkitsevä $p < 0,1$.

Tryptofaanin ohutsuolisulavuus huononi tilastollisesti suuntaa antavasti ($p < 0,1$) kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä sekä P16 ja P20 käsittelyiden ($p < 0,1$) välillä. Synteettinen DL-metioniini nosti metioniinin sulavuutta noin viidellä prosentilla ja ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,001$) käsittelyiden P20 ja P20M välillä. Myös verrattaessa eri valkuaismäärän omaavia ryhmiä (P16 ja P20) metioniinin sulavuudessa oli tilastollisesti merkitsevä ero ($p < 0,01$). P16 käsittelyissä metioniinin määrä oli korkeampi (7,10 ja 6,89 g/kg KA) kuin P20 käsittelyissä (3,98 ja 6,35 g/kg KA). Synteettinen histidiini nosti P16 käsittelyissä histidiinin sulavuuden noin viidellä prosentilla 77,9 prosentista 82,2 prosenttiin ja ero oli tilastollisesti merkittävä ($p < 0,05$). Lysiinin näennäinen ohutsuolisulavuus nousi valkuaispitoisuuden laskiessa ja ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,05$) kontrollin ja muiden

käsittelyiden välillä. Kysteiinin sulavuus nousi kaksinkertaiseksi lisättäessä metioniiniä käsittelyyn P20 ($p < 0,05$). Kysteiinin sulavuus oli korkein käsittelyssä P16M, jossa synteettistä metioniiniä oli lisätty eniten. Histidiiniä lisättyssä käsittelyssä (P16MH), kysteiinin sulavuus laski lähes 20 prosenttia. Kysteiiniä oli myös vähiten kyseisessä käsittelyssä. Kysteiini osoittautui heikoiten sulavaksi aminohapoksi (14,6-42,0 %) ja seuraavana oli välttämättömistä aminohapoista treoniini (63,2-67,6 %). Parhaiten sulaviksi välttämättömiksi aminohapoiksi osoittautuivat metioniini, lysiini, histidiini sekä arginiini.

Proliinin sulavuus laski lineaarisesti, kun valkuaispitoisuus käsittelyissä laski (66,6 – 61,2 %). Muiden ei-välttämättömien aminohappojen ohutsuolisulavuus ei muuttunut merkitsevästi. Parhaiten sulavaksi ei-välttämättömäksi aminohapoksi osoittautuivat glutamiini (76,7 – 77,7 %), alaniini (76,0 – 77,5 %) ja tyrosiini (73,3 – 77,2 %). Heikoiten sulavaksi ei-välttämättömäksi aminohapoksi osoittautui seriini (57,4 – 62,6 %).

Taulukko 8.

Aminohappojen näennäinen kokonaissulavuus

	P24	P20	P20M	P16M	P16MH	SEM	C1	C2	C3	C4
Metioniini	78.1	73.7	84.8	86.5	87.3	1.964	*	***	***	0.773
Histidiini	81.8	79.5	81.2	83.3	84.3	0.853	0.800	***	0.184	0.394
Lysiini	81.2	81.3	81.9	84.6	79.5	0.988	0.569	0.653	0.631	**
Kysteiini	50.8	32.0	48.7	52.1	43.2	4.113	0.160	O	*	0.150
Treoniini	70.8	65.0	67.6	68.6	64.4	1.180	**	0.857	0.149	*
Tryptofaani	68.2	61.8	60.7	60.6	60.9	1.943	**	0.804	0.688	0.928
Isoleusiini	73.2	70.5	72.9	73.4	70.7	0.991	0.245	0.727	0.115	O
Leusiini	76.3	74.0	75.7	77.5	74.0	0.766	0.236	0.250	0.135	**
Valiini	72.6	69.2	71.0	73.0	68.9	0.875	*	0.326	0.181	**
Fenylalaniini	75.7	72.0	74.1	76.8	73.2	1.114	0.196	0.102	0.202	*
Arginiini	81.7	79.5	80.1	82.5	79.8	0.789	0.175	0.103	0.649	*
Ei-välttämättömät										
Tyrosiini	71.9	67.6	70.9	72.5	68.3	1.432	0.210	0.442	0.117	O
Alaniini	75.7	71.7	72.7	74.1	69.5	1.035	**	0.720	0.500	**
Asparagiini	72.3	68.8	68.7	69.0	64.0	0.826	***	*	0.937	***
Glutamiini	79.3	76.4	76.4	76.6	73.3	0.639	***	*	0.986	**
Glysiini	79.4	75.0	75.6	78.9	76.0	1.141	*	O	0.706	O
Proliini	75.3	70.7	70.8	74.2	69.9	1.125	**	0.264	0.946	*
Seriini	69.3	63.7	64.8	68.1	63.3	1.158	**	0.227	0.496	**
Total	77.2	73.9	75.2	77.0	73.5	0.751	*	0.356	0.260	**

C1: kontrolli vs. Muut, C2: proteiinitasojen vertailu, P16 vs. P20, C3: metioniinilisän vaikutus, P20 vs. P20M, C4: histidiinilisän vaikutus, P16M vs. P16MH. SEM=keskiarvon keskivirhe.

* Merkitsevyystaso $p < 0,05$.

** Merkitsevyystaso $p < 0,01$.

*** Merkitsevyystaso $p < 0,001$.

O Suuntaa-antavasti merkitsevä $p < 0,1$.

Aminohappojen näennäisessä kokonaissulavuudessa havaittiin enemmän tilastollista merkitsevyyttä käsittelyiden välillä kuin näennäisessä ohutsuolisulavuudessa. Metioniinin sulavuus parani merkitsevästi kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä ($p < 0,05$) sekä P20 ja P16 käsittelyiden ($p < 0,001$), että P20 ja P20M käsittelyiden ($p < 0,001$) välillä. Histidiinin kokonaissulavuus oli merkitsevästi parempi ($p < 0,001$) käsittelyissä, joissa oli pienempi valkuaispitoisuus. Mutta histidiinilisä nosti näennäistä kokonaissulavuutta vain yhden prosentin (83,3 % ja 84,3 %), eikä

vaikutus ollut tilastollisesti merkitsevä. Lysiinin, leusiinin ja valiinin kokonaissulavuus laski merkitsevästi P16M ja P16MH käsittelyiden välillä ($p < 0,01$). Myös treoniinin, fenylalaniinin ja arginiinin ($p < 0,05$) sekä isoleusiinin ($p < 0,1$) sulavuudet huononivat merkitsevästi käsittelyiden P16M ja P16MH välillä. Kysteiinin kokonaissulavuus parani käsittelyissä, joissa oli metioniinilisä. Tryptofaanin ($p < 0,01$) ja valiinin ($p < 0,05$) sulavuudet huononivat valkuaispitoisuuden laskiessa tilastollisesti merkitsevästi.

Ei-välttämättömistä aminohapoista tyrosiinin ja glysiinin ($p < 0,1$), proliinin ($p < 0,05$), alaniinin, glutamiinin ja seriinin ($p < 0,01$) sekä asparagiinin ($p < 0,001$) kokonaissulavuus heikkeni P16M ja P16MH käsittelyiden välillä. Kaikkien ei-välttämättömien aminohappojen, lukuun ottamatta tyrosiinin, sulavuus laski merkitsevästi kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä. Asparagiinin ja glutamiinin ($p < 0,001$), alaniinin, proliinin ja seriinin ($p < 0,01$) sekä glysiinin ($p < 0,05$) sulavuudet huononivat merkitsevästi. Asparagiinin ja glutamiinin ($p < 0,05$) sekä glysiinin ($p < 0,1$) sulavuudet huononivat merkitsevästi P20 ja P16 käsittelyiden välillä. Aminohappojen yhteenlasketun kokonaissulavuuden keskiarvo laski kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä ($p < 0,05$) sekä P16M ja P16MH käsittelyiden välillä ($p < 0,01$) merkitsevästi. Synteettinen metioniinilisä paransi metioniinin ($p < 0,001$) ja heikensi kysteiinin ($p < 0,05$) kokonaissulavuutta merkitsevästi.

5.4 TYPEN HYVÄKSIKÄYTTÖ

Typen hyväksikäyttö kokeessa parani valkuaispitoisuuden laskiessa. Typen saanti laski lineaarisesti, kun valkuaisen määrä rehussa väheni. Sonnan typen määrässä ei ollut selvää muutosta, ja kaikissa käsittelyissä määrä pysyi 3,1 ja 3,4 gramman välillä. Virtsan typen määrä laski erittäin merkitsevästi 8,4 grammasta 5,6 grammaan päivässä ($p < 0,001$). Urean sekä urean sisältämän typen määrä vähenivät myös erittäin merkitsevästi ($p < 0,001$) valkuaispitoisuuden vähentyessä. Typen imeytyminen, eli osuus joka ei erittynyt sonnan mukana, oli tilastollisesti merkittävää kontrollin ja muiden käsittelyjen välillä ($p < 0,001$), vähentyen lineaarisesti 10,0 grammasta 6,5 grammaan. Typen imeytyminen erosi myös P20 ja P16 käsittelyiden välillä erittäin merkitsevästi ($p < 0,001$) sekä P16M ja P16MH käsittelyiden välillä tilastollisesti merkitsevästi ($p < 0,01$).

Taulukko 9. Typen metabolia

	P24	P20	P16	P16M	P16MH	SEM	C1	C2	C3	C4
N syöinti	13.2	11.7	11.5	10.9	9.8					
Sonnan N g/pv	3.2	3.1	3.4	3.0	3.3	0.294	0.977	0.786	0.500	0.586
Virtsan N g/pv	8.4	7.4	7.0	6.6	5.6	0.218	***	***	0.312	*
Urea g/pv	16.1	12.9	13.0	12.4	10.5	0.597	***	*	0.827	O
Urean N g/pv	7.5	6.0	6.1	5.8	4.9	0.279	***	*	0.827	O
Urean N % / Virtsan N	89.0	81.6	86.4	87.2	87.4	1.978	0.157	0.133	0.107	0.956
Imeytynyt N g/pv	10.0	8.6	8.1	7.8	6.5	0.294	***	**	0.261	*
N pidättyvyys										
g /pv/ eläin	1.5	1.2	1.1	1.2	0.9	0.348	0.304	0.808	0.743	0.548
%-osuus syödyistä	11.5	10.5	9.3	11.2	9.1	3.379	0.700	0.937	0.798	0.686
g / elopaino kg	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.023	0.318	0.833	0.815	0.538
g / metabolinen elopaino kg	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.045	0.314	0.827	0.797	0.541
%-osuus imeytyneestä	15.2	14.4	12.7	15.4	12.1	4.741	0.770	0.963	0.810	0.658

C1: kontrolli vs. Muut, C2: proteiinitasojen vertailu, P16 vs. P20, C3: metioniinilisän vaikutus, P20 vs. P20M, C4: histidiinilisän vaikutus P16M vs. P16MH. SEM=keskiarvon keskivirhe.

* Merkitsevyystaso $p < 0,05$.

** Merkitsevyystaso $p < 0,01$.

*** Merkitsevyystaso $p < 0,001$.

O Suuntaa-antavasti merkitsevä $p < 0,1$.

Typen pidättymisessä ei havaittu tilastollista eroa vaan se säilyi vaihdellen 1,1 gramman ja 1,6 gramman välillä. Typen pidättyminen oli prosentuaalisesti korkein P16MH käsittelyn eläimillä, jossa valkuaisen ja typen pitoisuus olivat matalimmat. Typen pidättyminen painokiloa kohden oli jokaisessa käsittelyssä sama (0,1 g/kg elopaino). Käsittelyn P16M eläimillä pidättyi imeytyneestä tyypestä noin viisi prosenttia enemmän kuin muiden käsittelyiden eläimillä, mutta se ei ollut tilastollisesti merkitsevää.

5.5 VERIPLASMAN AMINOHAPPO- JA UREAPITOISUUDET

Urean veriplasmapitoisuudessa ei havaittu merkitsevää eroa valkuaispitoisuuden vähentyessä, vaan se pysyi kontrollin 5,96 mmol/l ja käsittelyn P16M 4,92 mmol/l välillä. Urean määrä väheni kuitenkin kontrollin ja kolmen seuraavan käsittelyn välillä, mutta nousi takaisin lähelle kontrollia käsittelyssä P16MH, johon oli lisätty histidiiniä. Eniten veriplasmassa oli glutamiinia, alaniinia ja glysiinia. Pienin pitoisuus mitattiin kystiinille (eli dikysteiini) sekä metioniinille. 3-Metyylihistidiinin pitoisuusero oli tilastollisesti merkitsevä eri valkuaisastajien ($p < 0,05$) P16 ja P20 välillä sekä histidiinilisän merkitystä ($p < 0,05$) testattaessa.

Taulukko 10.

Dieetin valkuaispitoisuuden vaikutus plasman urea ja aminohappo pitoisuuksiin

Plasman aminohapot	mM									
	P24	P20	P20M	P16M	P16MH	SEM	C1	C2	C3	C4
Alaniini	415.3	449.1	469.2	535.7	471.2	38.956	0.151	0.273	0.721	0.260
Arginiini	148.0	148.7	153.8	148.6	157.0	12.329	0.773	0.904	0.776	0.636
Asparagiini	73.04	64.90	67.44	62.25	60.67	2.6611	**	O	0.510	0.682
Kysteiini	34.63	36.03	37.20	37.88	39.95	3.5803	0.445	0.530	0.821	0.688
Kystiini	6.110	6.662	8.187	12.63	15.10	1.7136	*	**	0.539	0.324
Glutamiini	850.0	733.8	703.1	606.2	667.3	78.765	O	0.316	0.787	0.591
Glysiini	305.3	261.6	294.3	282.2	284.7	13.553	0.126	0.694	0.108	0.899
Histidiini	76.14	70.33	72.06	76.65	71.42	2.626	0.249	0.297	0.648	0.179
Isoleusiini	79.92	72.69	75.63	65.54	65.43	4.040	*	*	0.614	0.985
Leusiini	161.1	150.1	150.5	134.8	135.1	6.489	*	*	0.967	0.975
Lysiini	185.4	175.2	190.1	190.1	168.8	11.386	0.739	0.782	0.370	0.206
Metioniini	44.06	42.57	42.35	39.75	42.64	2.493	0.437	0.619	0.951	0.426
Fenyyialaniini	94.54	85.09	87.47	85.90	79.72	3.830	*	0.379	0.666	0.272
Prolini	135.8	133.7	135.0	142.9	139.1	8.181	0.837	0.429	0.909	0.743
Seriini	234.0	241.5	232.6	212.9	208.4	12.809	0.490	0.057	0.627	0.810
Treoniini	120.6	109.5	104.4	95.28	90.39	5.305	**	*	0.506	0.525
Tryptofaani	51.71	45.36	39.84	41.35	39.35	2.699	**	0.417	0.169	0.607
Tyrosiini	60.74	54.32	53.37	52.51	47.11	3.698	*	0.29	0.859	0.318
Valiini	196.0	181.2	182.7	168.0	165.4	7.899	*	O	0.898	0.819
3-MH	6.828	5.974	5.774	6.817	9.817	0.941	0.803	*	0.882	*
Plasman urea mmol/l	5.96	5.52	4.98	4.92	5.54	0.424	0.150	0.951	0.382	0.317

C1: kontrolli vs. Muut, C2: proteiinitasojen vertailu, P16 vs. P20, C3: metioniiniliisän vaikutus, P20 vs. P20M, C4: histidiiniliisän vaikutus P16M vs. P16MH. SEM=keskiarvon keskivirhe.

* Merkitsevyystaso $p < 0,05$.

** Merkitsevyystaso $p < 0,01$.

*** Merkitsevyystaso $p < 0,001$.

O Suuntaa-antavasti merkitsevä $p < 0,1$.

Muiden aminohappojen osalta joitakin merkitseviä vaihteluita havaittiin. Asparagiinin, treoniinin ja tryptofaanin pitoisuudet veressä laskivat merkitsevästi ($P < 0,01$) kun valkuaispitoisuus rehussa laski kontrollin tasosta. Isoleusiinin, leusiinin, fenylalaniinin, tyrosiinin ja valiinin pitoisuudet plasmassa laskivat myös merkitsevästi ($P < 0,05$) valkuaispitoisuuden laskiessa kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä. Kystiinin (eli dikysteini) pitoisuus veriplasmassa kasvoi merkitsevästi ($P < 0,05$), kun valkuaispitoisuus rehussa laski ja synteettisen metioniinin pitoisuus lisääntyi. Ero P20 ja P16 käsittelyiden välillä oli merkitsevää ($P < 0,01$), kun kystiinin pitoisuudet ryhmissä P20 ja P20M olivat 6,7 ja 8,2 mM, ja ryhmissä P16M ja P16MH pitoisuudet olivat 12,6 ja 15,1 mM. Myös treoniinin, isoleusiinin ja leusiinin plasma pitoisuudet laskivat tilastollisesti suuntaa antavasti P20 ja P16 ryhmien välillä. Metioniinin pitoisuus pysyi samalla tasolla dieetistä riippumatta, 39,75 ja 44,06 mM välillä. Myös histidiinin pitoisuus säilyi samalla tasolla, eikä tilastollisesti merkittävää eroa ollut.

6 TULOSTEN TARKASTELU

6.1 RAVINTOAINEIDEN SULAVUUS

Aiemmin tehdyssä Dahlmanin (2002) tutkimuksessa kaikkien ravintoaineiden sulavuus heikkeni valkuaispitoisuuden laskiessa. Tässä tutkimuksessa ainoastaan valkuaisen sulavuus heikkeni valkuaispitoisuuden laskiessa. Sen sijaan raakarasvan ja kuiva-aineen sulavuus pysyi lähes samana ja hiilihydraatin sulavuus jopa parani valkuaispitoisuuden laskiessa.

Kuten aiemmin tutkielmassani on mainittu, sinikettu käyttää rasvan erittäin hyvin hyödyksi ja sen sulavuudeksi saatiin 94,4 – 95,5 prosenttia. Vaikka tilastollista merkitsevyyttä rasvan sulavuudessa havaittiin, oli ero enimmillään puolitoista prosenttia, joka ei biologisesti ole kovin merkittävä. Rasvan sulavuus vastasi aiemmin siniketuilla tehtyjen tutkimusten sulavuuksia (While yms. 2005, Rouvinen yms. 1998).

Zhangin yms. (2016) tutkimuksessa rasva:hiilihydraatti suhteen havaittiin vaikuttavan proteiinin sulavuuteen. Tulosten mukaan optimaalinen suhde on noin 2,2, mutta sen noustessa 3,2:een proteiinin sulavuus heikkenee. Tutkimuksessamme proteiinin sulavuus laski kun rasva:hiilihydraatti suhde kasvoi 2,0:sta 2,8:aan. Käsittelyiden proteiinipitoisuus laski

myös lineaarisesti, mikä on todennäköinen syy näennäisen sulavuuden heikkenemiselle. Käsittelyn P16M proteiinipitoisuus oli edelleen matalampi mutta siinä proteiinin sulavuus oli korkeampi. Käsittelyn P16M rasva:hiilihydraatti suhde (1,9) oli lähempänä Zhangin yms. (2016) optimia, kuin käsittelyn P20M (2,8), mikä voi selittää korkeamman proteiinin sulavuuden. Rehun korkean tuhka pitoisuuden on todettu vaikuttavan negatiivisesti rasvan ja rasvahappojen sulavuuteen siniketuilla (Burlikowska ja Szymeczko, 2007), mutta tässä tutkimuksessa niiden välillä ei ollut korrelaatiota.

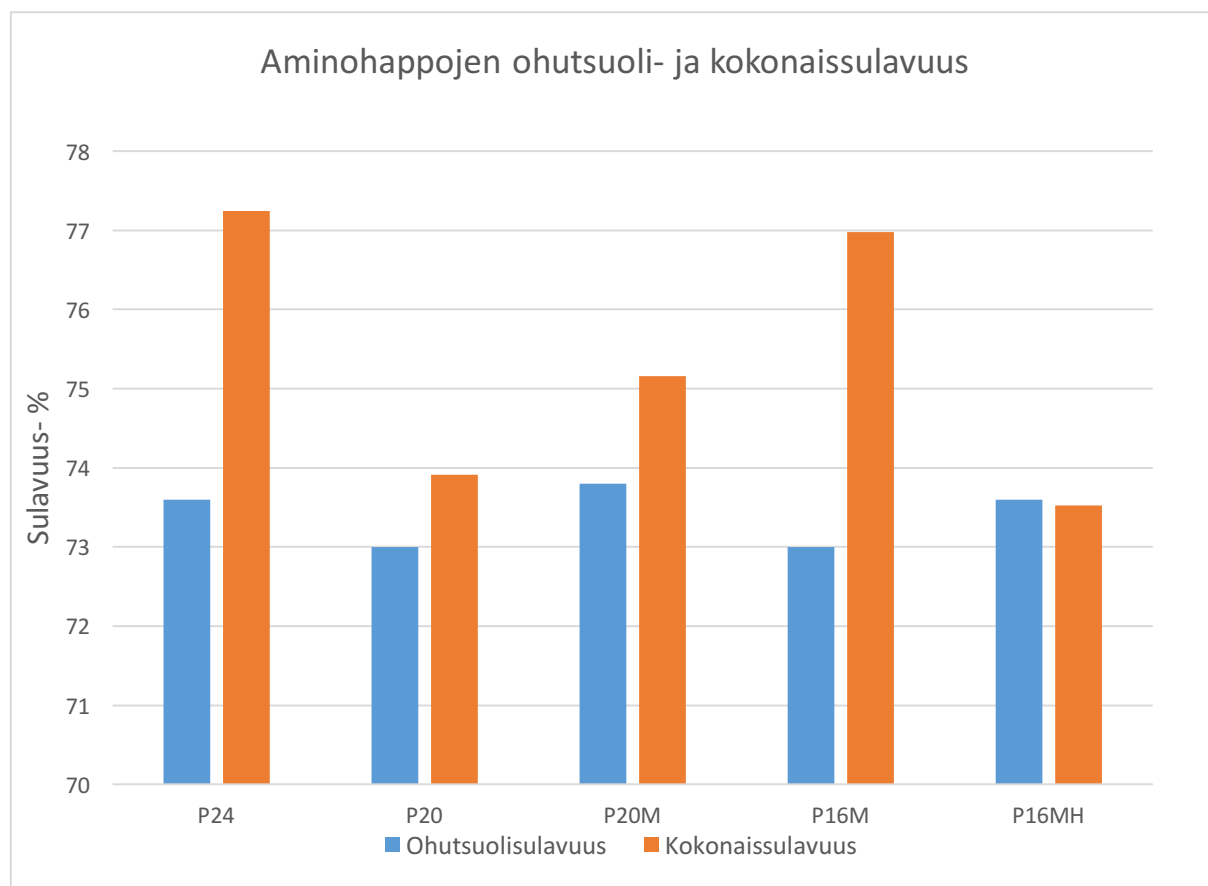
Valkuainen korvattiin rehuissa lähinnä hiilihydraatilla, mikä todennäköisesti selittää hiilihydraatin korkeamman sulavuuden. Kypsennetty vehnätärkkelys on erittäin hyvin sulavaa ja sitä oli P16M ja P16MH rehuissa 7,1 prosenttia kuiva-aineesta, kun P20 rehuissa vain 4,9 prosenttia. Vhilen (2005) tutkimuksessa tärkkelyksen kokonaissulavuus oli jopa 98,4, mikä selittäisi tämän tutkimuksen merkittävän hiilihydraatin sulavuuden nousun. Kyseisessä tutkimuksessa kokonaishiilihydraatin sulavuus oli kuitenkin vielä parempi, kuin tässä tutkimuksessa, mikä johtunee erilaisesta rehujen raaka-ainepohjasta. Siniketun hyvä hiilihydraattien sulatus verrattuna minkkiin selittyy tehokkaammalla amylaasin tuotannolla. Sen lisäksi siniketulla on minkkiin verrattuna suurempi ja kehittyneempi paksusuoli sekä tehokkaampi mikrobifermentaatio (Elnif ym., 1988, Vhile ym., 2005). Kypsennetyn tärkkelyksen on havaittu sulavan paremmin kuin raa'an. Sunin ym. (2006) tutkimuksessa siolla oli huomattavasti parempi sulavuus ekstrudoidulla kuin raa'alla tärkkelyksellä, mutta hiilihydraatin lähteellä oli vaikutusta. Esimerkiksi ohran kohdalla ekstruusiolla ei ollut merkitystä, toisin kuin peruna- ja vehnätärkkelyksellä. Tässä tutkimuksessa ohra oli esikypsennetty ja vehnätärkkelys kypsennettyä.

Aiemmissä tutkimuksissa metioniinilisän on havaittu parantavan raakarasvan, hiilihydraatin ja kuiva-aineen sulavuutta etenkin pienemmällä valkuaispitoisuudella (Dahlman ym., 2002). Dahlmanin mukaan metioniini on voinut olla rajoittavana tekijänä ruoansulatusentsyymejä tuottavissa synteeseissä. Tämän tutkimuksen tulokset tukevat tätä havaintoa hiilihydraatin osalta. Tässä tutkimuksessa heikoin hiilihydraatin sulavuus oli P20 ryhmällä, jossa metioniinin määrä oli pienin (3,98 g/kg KA). Kyseisen käsittelyn hiilihydraatin määrä ei kuitenkaan ollut pienin, vaan se oli käsittelyssä P20M. Ryhmässä P20M metioniinin määrä oli 6,35 ja hiilihydraatin sulavuus parani 1,8 prosentilla, vaikka hiilihydraatin määrä laski 16 grammalla.

Kuiva-aineen ja raakarasan sulavuudessa ei havaittu merkitseviä eroja eri metioniini pitoisuuksilla.

6.2 AMINOHAPPOJEN SULAVUUS

Aminohappojen sulavuus siniketuilla osoittautui hyväksi, mikä on havaittu aiemmissakin tutkimuksissa (Vhile, 2005; Ahlstrom ja Skrede, 1995), joissa sulavuus on ilmoitettu näennäisenä sulavuutena. Näennäinen aminohappojen sulavuus ei ota huomioon elimistöä vapautunutta endogeenista proteiinia tai mikrobeja, jotka vääristävät tuloksia. Tutkimusmenetelmänä näennäistä kokonaissulavuutta pidetään epätarkkana paksusuolella tapahtuvan mikrobifermentaation takia. Tämän takia varsinkin proteiinin ja aminohappojen sulavuuden määrittämistä sonnasta kyseenalaistetaan ja sulavuutta mitataan usein ohutsuolisulavuutena (Sauer ym. 1980; Sauer ym., 2000). Tässäkin tutkimuksessa aminohappojen sulavuutta tutkittiin näennäisenä sulavuutena, jolloin endogeenista eritystä ei erikseen oteta huomioon. Myös ohutsuolesta määritetyissä sulavuuksissa on mukana endogeeninen aines, joka on peräisin mahalaukusta ja ohutsuolesta.



Kuva 3. Aminohappojen ohutsuoli- ja kokonaissulavuuden vertailua eri valkuaiskäsittelyillä.

Kuva 3. osoittaa, että kokonaisuudessaan aminohappojen ohutsuolisulavuus (73,0 – 73,8 %) ei muuttunut yhtä huomattavasti, kuin kokonaissulavuus (73,5 – 77,2 %) valkuaisen vähentyessä. Aminohappojen kokonaissulavuus oli korkeampi, kuin ohutsuolisulavuus kaikissa muissa paitsi P16MH käsittelyssä, jonka kokonais- ja ohutsuolisulavuudet olivat hyvin lähellä toisiaan (73,5 % ja 73,6 %).

Szymeczko (2001) on saanut ohutsuoli- ja kokonaissulavuuksien avulla saatujen sulavuuksien eroiksi 9,8 prosenttia, ohutsuolisulavuuden ollessa matalampi, kuin kokonaissulavuus. Vhile ym. (2005) vertasi ohutsuoli- ja kokonaissulavuutta proteiinin ja aminohappojen osalta ja havaitsi, että ohutsuolisulavuus oli samaa luokkaa tai korkeampi kuin kokonaissulavuus suurimmalle osalle välttämättömistä aminohapoista ja matalampi suurimmalle osalle eivälttämättömistä aminohapoista. Vhilen ym. (2005) tutkimuksessa valkuaisen kokonaissulavuus vaihteli 82,5 – 86,4 % välillä ja tässä tutkimuksessa se oli merkittävästi matalampi, 66,51 – 75,63 %. Aminohappojen ohutsuolisulavuus osoittautui Vhilen ym. (2005) tutkimuksessa myöskin tasaisen korkeaksi 70,1 – 93,3 %, meidän vaihtelevampiin tuloksiin verrattuna, 14,6 – 91,6 %. Erot tutkimusten välillä johtuvat todennäköisesti rehujen erilaisesta raaka-ainepohjasta, eivätkä tulokset ole täysin verrattavissa toisiinsa. Vhilen ym. (2005) tutkimuksen koerehut sisälsivät muun muassa enemmän kalaa.

Dahlmanin (2002) tutkimuksessa merkitseviä eroja kokonaissulavuuksissa kontrollin ja muiden käsittelyiden välillä havaittiin kaikkien paitsi kysteiinin kohdalla. Meidän tutkimuksessa välttämättömien aminohappojen kohdalla vain treoniinin, tryptofaanin ja valiinin kohdalla havaittiin samaa. Kysteiinillä, tryptofaanilla ja treoniinillä oli välttämättömistä aminohapoista heikoin sekä ohutsuoli- että kokonaissulavuus. Näillä aminohapoilla on havaittu aiemmissakin tutkimuksissa olevan heikoin sulavuus ja parhaiten sulaviksi on osoittautunut metioniini, lysiini ja arginiini riippuen hieman proteiinin lähteestä (Szymeczko, 2001; Dahlman, 2002).

Vhile ym. (2005) havaitsi ohutsuoli- ja kokonaissulavuustutkimuksessaan, että kysteiini ja treoniini olivat aminohappoja, joilla oli huomattavasti heikompi ohutsuolisulavuus kuin kokonaissulavuus. Meidän tutkimus tukee tätä havaintoa kysteiinin osalta, jonka ohutsuolisulavuus oli huomattavasti matalampi (14,6 – 42), kuin kokonaissulavuus (32,0 – 52,1). Treoniinin kohdalla ei havaittu yhtä suurta eroa menetelmien välillä. Metioniinin kohdalla tapahtui päinvastoin. Sen ohutsuolisulavuus (84,2 – 91,6) on huomattavasti

korkeampi, kuin sen kokonaissulavuus (73,7 – 87,3). Tätä havaintoa tukee Vhilen ym. (2005) tulokset. Metioniini on rajoittavana tekijänä proteiinisynteesissä ja jos sitä ei ole elimistössä saatavilla, proteiinisynteesiä ei tapahdu (Stryer, 1998). Luultavasti tämän takia metioniinin sulatus ohutsuolessa on tehokasta, eikä metioniinia jää paksusuolen mikrobien fermentoitavaksi. Sen lisäksi synteettisen DL-metioniinin sulavuus on parempi kuin rehusta saatavan. Ketuilla on kuitenkin suhteellisen hyvin kehittynyt paksusuoli ja sen mikrobiston avulla osa ravintoaineista ja aminohapoista fermentoituu ohutsuolen jälkeenkin mikrobien käyttöön energiaksi (Szymeczko, 1992). Metioniinin lisääminen vaikutti vain metioniinin ja kysteiinin sulavuuteen positiivisesti sekä ohutsuoli-, että kokonaissulavuudessa.

6.3 TYPEN HYVÄKSIKÄYTTÖ

Niin kuin aiemmissakin tutkimuksissa, myös tässä havaittiin eritetyn typen määrän vähenevän huomattavasti, kun valkuaisen määrä ruokinnassa laskee. Dahlmanin (2002) tutkimuksessa typen erityis väheni 36,8 % kun valkuaisen määrä rehussa laski 320 g 250 grammaan. Valajan ym. (1993) tutkimuksessa sioilla typen erityis väheni 38,3 %. Tässä tutkimuksessa ympäristöön erittyneen typen määrä laski lineaarisesti yhteensä 33,3 %.

Typen pidättyminen eläimeen ei laskenut merkitsevästi ($p=0,449$) rehun valkuaispitoisuuden laskiessa koeryhmien välillä. Voidaan siis sanoa, että myös pienin valkuaispitoisuus tyydytti tämän ikäisten eläinten valkuaisstarpeen. Muussa tapauksessa myös typen pidättyminen olisi laskenut lineaarisesti, kun typen saanti rehusta laski. Dahlmanin (2002) tekemässä tutkimuksessa typen pidättyminen oli merkitsevästi riippuvainen rehun valkuaispitoisuudesta, kun kyseessä oli yhdeksän viikonikäiset kasvavat siniketut. Yhdeksän viikkoisilla eläimillä typen pidättyminen eläintä kohden oli noin 2 g ja 21-viikkoisilla se oli noin 2,5g. Eläinten päivittäinen kasvu oli 21-viikkoisilla 60 g ja yhdeksän viikkoisilla hieman pienempi, 58 g. Kyseisen julkaisun mukaan 25 % tarvitaan ylläpitotarpeisiin ja jäljelle jäävän osuuden siniketun elimistö käyttää koon (60%) ja turkin kasvuun (40%). Tässä kokeessa 23-viikkoisilla eläimillä typen pidättyminen oli enää noin 1,3 g, josta Dahlmanin (2002) mukaan 0,3 g tarvittaisiin ylläpitoon ja noin 1 g jäisi kasvuun ja karvan kehittymiseen. Tämä määrä riittää tutkimuksen mukaan karvan kasvulle ottaen huomioon, että eläimen koon kasvuun ei tässä vaiheessa enää tarvita typpeä.

Dahlmanin (2002) tutkimuksen lisäksi Gugolek ym. (2012) sekä Gugolek ym. (2017) havaitsi, että typen pidättyminen kasvoi suuremman metioniinipitoisuuden myötä tiettyyn rajaan asti. Optimaalisen aminohappokoostumuksen todettiin vaikuttavan positiivisesti typen ja proteiinin sulavuuteen. Kaikista suurin hyöty saatiin Zhangin (2012) mukaan ruokinnalla, jossa oli synteettinen metioniini ja lysiini lisättynä, kun taas Dahlmanin (2002) tutkimuksessa lysiinillä ei havaittu olevan hyötyä.

6.4 VERIPLASMAN AMINOHAPPO- JA UREAPITOISUUDET

Gugolek ym. (2012) tutkivat synteettisen metioniinin vaikutusta veriparametreihin ja havaitsivat positiivisia vaikutuksia. Metioniinin lisäys nosti hemoglobiinitasoa, mikä viittaisi siihen, että metioniinilla on positiivista vaikutusta verisolujen muodostumiseen eli hematopoieesiin. Metioniinilla havaittiin olevan myös positiivinen vaikutus hiilihydraattimetaboliaan, sillä se nosti seerumin glukoositasoja. Tässäkin tutkimuksessa hiilihydraatin sulavuus parani käsittelyissä, joissa oli enemmän metioniinia mutta se selittyi todennäköisesti hyvin sulavan hiilihydraatin suuremmalla määrällä. Meidän tutkimuksessa ei mitattu veren glukoosipitoisuutta, jolloin tätä olisi voitu tutkia enemmän. Gugolekin ym. (2012) tutkimuksessa metioniinilla oli vaikutusta myös joidenkin entsyymien aktiivisuustasoihin. Esimerkiksi seerumin kreatiinikinaasin pitoisuus laski eläimillä, jotka saivat synteettistä metioniinia. Korkea kreatiinikinaasin aktiivisuus veressä indikoi lihasvaurioista, eli tulokset viittaisivat metioniinin lihaskudosta suojaavaan vaikutukseen. Havainto tukee tietoa siitä, että metioniini lisää proteiinisynteesiä ja kasvua (Stryer, 1998). Meidän tutkimuksessa ei kreatiinikinaasin pitoisuutta kuitenkaan mitattu. Synteettisellä DL-metioniinilla ei ollut vaikutusta veriplasman arvoihin muiden kuin metioniinin kohdalla, jonka pitoisuus ei laskenut toisin kuin monien muiden aminohappojen pitoisuus. Synteettisellä L-histidiinilla oli vaikutusta ainoastaan 3-metyylihistidiinin pitoisuuteen, joka nousi 6,8 mM:sta 9,8 mM:iin.

Kuvassa 2. havainnollistin ylimääräisten aminohappojen hajotusprosessin, jossa elimistön ylimääräiset aminohapot hajotetaan ammoniakiksi ja kuljetetaan sitten glutamiinina muiden aminohappojen synteesiä varten tai maksaan hajotettavaksi. Glutamiinin pitoisuus plasmassa laski vähentyneen valkuaisen myötä (taulukko 10.), joten ylimääräisten aminohappojen kuljetus verenkierron mukana väheni rehun matalamman valkuaisen myötä. Myös plasman urea-pitoisuuden väheneminen kontrollin, P20- , P20M- ja P16M - käsittelyiden välillä viittaa

ylimääräisten aminohappojen katabolian vähenemiseen. Plasman aminohappo- ja urea arvojen perusteella voidaan siis päätellä, että matalammalla valkuaismäärällä ylimääräisten aminohappojen saanti vähenee.

3-Metyylihistidiinin pitoisuuden kasvu virtsassa viittaa Rathmacherin (2000) mukaan kohonneeseen luustolihasten hajotukseen, sillä sitä ei uudelleen käytetä proteiinisynteesissä. Histidiinilisän aiheuttama 3-metyylihistidiinin (3-MH) merkitsevästi suurempi ($p < 0,05$) pitoisuus johtuu todennäköisesti suuremmasta esiasteen eli histidiinin saannista muihin käsittelyihin verrattuna (Reporter, 1969). Tässä tutkimuksessa virtsan mukana eritetyn 3-MH:n määrää ei analysoitu. Aktiinin ja myosiinin hajotuksessa muodostunut 3-MH vapautuu kuitenkin veriplasmaan ja sitä kautta eritetään edelleen virtsan mukana elimistöstä, mikä viittaisi siihen, että plasman 3-MH pitoisuus indikoi kohonneesta luustolihasten hajotuksesta (Harris, 1981). Ei kuitenkaan tiedetä, kuinka suuri osuus plasman 3-MH määrästä olisi lopulta erittynyt virtsan mukana.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä maisterintutkielmassa tutkittiin, miten rehun pienentynyt valkuaispitoisuus ja aminohappojen täydennys DL-metioniinilla ja L-histidiinilla vaikuttavat sinikettujen ravintoaineiden sulavuuteen ja valkuaisen hyväksikäyttöön. Tutkimus tehtiin sulavuuskokeena typpitasemenetelmällä loppukasvatusvaiheessa. Hypoteesina oli, että matalammalla valkuaispitoisuudella ei ole negatiivista vaikutusta ravintoaineiden sulavuuteen loppukasvatuksen aikana.

Tulokset vastasivat hypoteesia. Virtsan mukana eritetyn typen määrä väheni lineaarisesti, kun valkuaispitoisuus väheni. Typen pidättymisessä ei ollut merkitsevää eroa käsittelyiden välillä, vaikka sen saanti väheni. Tutkimuksen perusteella voidaan siis todeta, että matalammallakin valkuaisasolla typen määrä tyydytti eläimen tarpeen loppukasvatuskaudella eikä rajoittanut eläimen kasvua. Myös hypoteesi, jonka mukaan ravintoaineiden sulavuus ei heikkene matalammalla valkuaispitoisuudella toteutui. Ravintoaineiden sulavuudessa ei havaittu suurta vaihtelua valkuaisen vähentyessä, joten voidaan arvioida niiden saannin olleen jokaisella käsittelyllä riittävää. Toteutunut valkuaisen osuus metabolisesta energiasta ei kuitenkaan vaihdellut suunnitellun mukaisesti, eikä se pienentynyt selkeästi käsittelyiden välillä.

Aminohappojen kokonaissulavuus osoittautui siniketuilla korkeammaksi kuin ohutsuolisulavuus kaikissa muissa käsittelyissä kuin vähiten valkuaista sisältävässä käsittelyssä. Tulokset vaihtelivat aiempien tutkimusten kanssa. Erot ohutsuoli- ja kokonaissulavuuksissa johtuu todennäköisesti eri raaka-ainekoostumuksista käsittelyrehuissa. Synteettinen DL-metioniini vaikutti ainoastaan metioniinin ja kysteiinin näennäiseen sulavuuteen merkitsevästi. L-histidiini vaikutti ainoastaan histidiinin näennäiseen ohutsuolisulavuuteen positiivisesti, mutta heikensi kaikkien ei-välttämättömien sekä osan välttämättömistä aminohapoista kokonaissulavuutta. Lisätyn metioniinin ja histidiinin määrä jäi melko pieneksi, eikä kyseisten aminohappojen määrät vaihdelleet käsittelyiden välillä tarpeeksi. DL-metioniinin vaikutus rikkiä sisältävien aminohappojen sulavuuteen oli kuitenkin merkitsevä, joten sen täydentäminen on suositeltavaa varsinkin matalammalla valkuaispitoisuudella ruokkiessa, sillä rikkiä sisältävät aminohapot osallistuvat karvan muodostumiseen.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajaani Jarmo Valajaa kärsivällisestä ja avuliaasta ohjauksesta. Kiitos myös Vappu Ylinen korvaamattomasta ja asiantuntevasta avustasi. Kannustuksesta ja tuesta kiitos kuuluu perheelleni, Sampolle, koulukavereilleni sekä työnantajalleni. Ilman teidän tukea tämä pitkäksi venynyt projekti ei olisi tullut päätökseen.

LÄHTEET

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Baker, D.H. 1994. Utilization of precursors for L-amino acids. In: D'Mello, J.P.F. (ed.) *Amino Acids in Farm Animal Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 37–61.
- Boisen, S., 1993. New strategy for optimizing amino acid supply to growing pigs. In: Verstegen, M.W.A., den Hartog, L.A., van Kempen, G.J.M., Metz, J.H.M. (Eds.), *Nitrogen Flow in Pig Production and Environmental Consequences*, Pudoc, Wageningen, pp. 157–162.
- Boisen, S., Hvelplund, T., & Weisbjerg, M. R. 2000. Ideal amino acid profiles as a basis for feed protein evaluation. *Livestock Production Science*, 64(2-3), 239-251.
- Burlikowska, K., & Szymeczko, R. 2007. Ileal digestibility of fat and fatty acids in polar foxes (*Alopex lagopus* L.) fed diets used during the reproductive period. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A — Animal Science*, 57(3), 136-141.
- Buraczewska L., Buraczewski S., Horszczaruk F., Jones A.S., Zebrowska T., 1975. An attempt to estimate the endogenous nitrogen content in the digesta of pigs fed on diets with proteins containing hydroxyproline. *Rocz Nauk Roln, Ser B Zootech* (4), 105-114.
- Dahlman, T., Kiiskinen, T., Mäkelä, J., Niemelä, P., Syrjälä-Qvist, L., Valaja, J., & Jalava, T. 2002. Digestibility and nitrogen utilisation of diets containing protein at different levels and supplemented with DL-methionine, L-methionine and L-lysine in blue fox (*Alopex lagopus*). *Animal feed science and technology*, 98(3-4), 219-235.
- Dahlman, T., Valaja, J., Niemelä, P. & Jalava, T. 2002. Influence of protein level and supplementary L-methionine and lysine on growth performance and fur quality of blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Agriculturae Scandinavica Section A — Animal Science*, 52: 174–182.

- Dahlman, T., Valaja, J., Jalava, T., & Skrede, A. 2003. Growth and fur characteristics of blue foxes (*Alopex lagopus*) fed diets with different protein levels and with or without DL-methionine supplementation in the growing-furring period. *Canadian journal of animal science*, 83(2), 239-245.
- Dahlman, T., Valaja, J., Venäläinen, E., Jalava, T., & Pölönen, I. 2004. Optimum dietary amino acid pattern and limiting order of some essential amino acids for growing-furring blue foxes (*Alopex lagopus*). *Animal Science*, 78(1), 77-86.
- D'Mello, J.P.F. 1995. Anti-nutritional substances in legume seeds. In: D'Mello, J.P.F. and Devendra, (eds) *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 135–172.
- D'mello, J. P. F. 2003. Amino acids as multifunctional molecules. *Amino acids in animal nutrition*, 2, 1-14.
- Elnif, J., Hansen, N. E., Mortensen, K. and Sørensen, H. 1988. Properties of mink trypsinogen/trypsin and chymotrypsinogen/ chymotrypsin compared with corresponding properties of these enzymes from other animals. In *Biology, pathology and genetics of fur bearing animals. Proceedings of the fourth international scientific congress in fur animal production, Toronto and Wisconsin*, pp. 308-319.
- Erisman, J. W., Bleeker, A., Galloway, J., & Sutton, M. S. 2007. Reduced nitrogen in ecology and the environment. *Environmental pollution*, 150(1), 140-149.
- Fuller, M.F., 1994. Amino acid requirements for maintenance, body protein accretion and reproduction in pigs. In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino Acids in Farm Animal Nutrition*, CAB International, pp. 155–184.
- Glem-Hansen, N. 1980. The protein requirements of mink during the growth period. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A — Animal Science*, 30:3, 336-344.

- Gugolek, A., Wyczling, T., Janiszewski, P., Sobiech, P., Wyczling, P., & Konstantynowicz, M. 2012. The effect of dietary methionine levels on the performance parameters of arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *Annals of Animal Science*, 12(3), 393-401.
- Gugolek, A., Wyczling, T., Strychalski, J., Kowalska, D., Konstantynowicz, M., & Zwoliński, C. 2017. Effect of diets with high methionine levels on growth performance, health status, nutrient digestibility and nitrogen retention in Arctic foxes. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(6), 1743-1749.
- Harris, C. I. 1981. Reappraisal of the quantitative importance of non-skeletal-muscle source of N ϵ -methylhistidine in urine. *Biochemical Journal*, 194(3), 1011-1014.
- Heger, J., Van Phung, T., Křížová, L., Šustala, M., & Šimeček, K. 2003. Efficiency of amino acid utilization in the growing pig at suboptimal levels of intake: branched-chain amino acids, histidine and phenylalanine+ tyrosine. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 87(1-2), 52-65.
- Hendriks, W. H., & Sritharan, K. 2002. Apparent ileal and fecal digestibility of dietary protein is different in dogs. *The Journal of nutrition*, 132(6), 1692S-1694S.
- Henry, Y., Colleaux, Y., & Seve, B. 1992. Effects of dietary level of lysine and of level and source of protein on feed intake, growth performance, and plasma amino acid pattern in the finishing pig. *Journal of Animal Science*, 70(1), 188-195.
- Hernesniemi, T. 2000. Ketun ravinnontarve ja rehut. [The fox's nutrient requirements and feeds.] In: Hernesniemi, T. (ed.) *Ketunkasvatuksen taito*. Finnish Fur Breeders Association, Gummerus Kirjapaino, Jyväskylä, Finland. 217 pp.
- Kasaoka, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., Kawahara, Y., Inoue, S., Tsuji, M., Ezaki, O., & Nakajima, S. 2004. Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition*, 20(11-12), 991-996.

- Kempe R., Koskinen N., Mäntysaari E. ja Strandén I., 2010. The genetics of body condition and leg weakness in the blue fox (*Alopex lagopus*), *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 60:3, 141-150.
- Koskinen, N., Tupeli, R., Sepponen, J., Rekilä, T. and Mikkola, T., 2011c. Sinikettujen rehun rasva- ja energiapitoisuuden vaikutus taloudellisiin tuotanto- ominaisuuksiin ja terveyteen. Rehunvalmistajien luentopäivät, Kalajoki 27.-28.1.2011, STKL ry.
- Luostarinen, S., Logrén, J., Grönroos, J., Lehtonen, H., Paavola, T., Rankinen, K., ja Järvenpää, M. 2011. Lannan kestävä hyödyntäminen, MTT-raportti.
- Makkink C.A., Heinz T., Souffrant W.B., Verstegen M.W.A., 1997. Endogenous N losses at the terminal ileum of young piglets fed diets based on four different protein sources. *Journal of Animal Feed Science* (6), 219-234.
- Martin, D., Salminen, J. M., Niemi, R. M., Heiskanen, I. M., Valve, M. J., Hellstén, P. P., & Nystén, T. H., 2009. Acetate and ethanol as potential enhancers of low temperature denitrification in soil contaminated by fur farms: a pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3), 1230-1238.
- NRC. 1982. Nutrient requirements of mink and foxes. Second revised edition by the National Research Council, Subcommittee on Furbearer Nutrition. National Academy Press, Washington D.C. 72 p.
- Peura, J., Serenius, T., & Strandén, I., 2004. Economic weights for litter size and skin character traits in Finnish blue fox production. *Animal Science Papers and Reports. Supplement*, 22(2).
- Piva, A., Prandini, A., Fiorentini, L., Morlacchini, M., Galvano, F., & Luchansky, J. B. 2002. Tributyrin and lactitol synergistically enhanced the trophic status of the intestinal mucosa and reduced histamine levels in the gut of nursery pigs. *Journal of animal science*, 80(3), 670-680.

- Rathmacher, J. A. 2000. Measurement and significance of protein turnover. In *Farm Animal Metabolism and Nutrition*, pp. 25-47. CABI, London.
- Reporter, M. 1969. 3-methylhistidine metabolism in proteins from cultured mammalian muscle cells. *Biochemistry*, 8(9), 3489-3496.
- Rouvinen, K., Kiiskinen, T. & Mäkelä, J. 1988. Digestibility of different fats and fatty acids in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 38: 405-412.
- Sauer, W. C., Just, A., Jorgensen, H. H., Fekadu, M., & Eggum, B. O. 1980. The influence of diet composition on the apparent digestibility of crude protein and amino acids at the terminal ileum and overall in pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 30(4), 449-459.
- Sauer WC, Fan MZ, Mosenthin R, & Drochner W. 2000. Methods for measuring ileal amino acid digestibility in pigs. In: D'Mello JPF, editor, *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. CABI Publishing, p 279 – 306.
- Silvenius, F., Koskinen, N., Kurppa, S., Rekilä, T., Sepponen, J., & Hyvärinen, H. 2011. Suomessa tuotetun minkin-ja ketunnahan elinkaariarviointi: MTT: n Suomen Turkiseläinten Kasvattajain Liitto ry:lle ja Turkistuottajat Oyj:lle tekemä tilaustutkimus.
- Skrede, A. 1978. Utilization of fish and animal byproducts in mink nutrition. I. Effect of source and level of protein on nitrogen balance, postweaning growth and characteristics of winter fur quality. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 28: 105–129.
- Stryer, L., 1998. *Biochemistry*, 5th Edition. Freeman, New York, 1064 pp.

- Szymeczko, R., Bieguszewski, H., Joergensen, G., & Børsting, C. 1992. The effect of protein source on digesta passage and nutrient digestibility in polar foxes. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 9, 275-281.
- Szymeczko, R. 2001. Ileal and total digestibility of amino acids in feeds used in mink and polar fox nutrition. *Journal of animal and feed sciences*, 10, Supplement 1, 2001, 211-222.
- Valaja, Jarmo, & Hilikka Siljander-Rasi, 1998. Effect of dietary crude protein and energy content on nitrogen utilisation, water intake and urinary output in growing pigs. *Agricultural and Food Science* 7.3: 381-390.
- Vhile, S. G., Skrede, A., Ahlstrøm, Ø., Szymeczko, R., & Hove, K., 2005. Ileal and total tract nutrient digestibility in blue foxes (*Alopex lagopus*) fed extruded diets containing different protein sources. *Archives of animal nutrition*, 59(1), 61-72.
- Wright, P. A. 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental biology*, 198(2), 273-281.
- Zhang, H.H., Yang F.H., Jiang Q.K., Yue Z.G., Xing X.M., Sung W.L., & Li G.Y. 2012c. Effect of low-protein, DL-methionine and lysine – supplemented diets on growth performance of blue fox (*Alopuslagopus*) during the growing-furring period. *Proceedings of the Xth International Scientific Congress in Fur Animal Production*, 25-31.
- Zhang, T., Zhong, W., Sun, W. L., Wang, Z., Sun, H., Fan, Y., & Li, G. 2016. Effects of dietary fat: carbohydrate ratio on nutrient digestibility, serum parameters, and production performance in male silver foxes (*Vulpes vulpes*) during the winter fur-growing period. *Canadian journal of animal science*, 97(2), 199-206.