

Hevosen perusravinnon ravintoaineiden kvantitatiiviset muutokset ravinnon kulkeutuessa ruuansulatuskanavan läpi

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

kemian laitos

10.12.2017

Anne Lähde

TIIVISTELMÄ

Tässä tutkielmassa selvitettiin millaisia kvantitatiivisia ravintoaine ja ravinne muutoksia tapahtuu pitoisuuksissa, kun ravinto kulkee hevosen ruuansulatuskanavan läpi. Koeryhmän hevosille annettiin perusravintona vain heinää ja kokokauraa. Hevonen on suurikokoinen herbivorinen eläin, joka tarvitsee paljon energiaa ja muita ravintoaineita elintoimintojensa ylläpitämiseksi. Hevosen perusravinnon orgaanisen aineksen määrä on vähintään 90 % kuiva-aineesta, koska maaperäaineksettoman heinän ja kauran sisältämän tuhkan määrän oletetaan olevan alle 9 %. Sekä orgaanisella että epäorgaanisella fraktiolla, on hevoselle ravitsemuksellinen merkitys. Ruoka-aineista ja ravinteista osa hajoaa ruuansulatuskanavan erilaisten toimintojen avustamana ja absorboituu hevosen solujen hyödynnettäväksi sekä ohutsuolen että paksusuolen kautta.

Tutkielman kokeellisessa osassa syötettiin kuuden hevosen koeryhmälle kahdelta eri viljelijältä ja kahdella eri tavalla säilöttyä korsirehua sekä kokojyväkauraa. Korsirehujen säilöntämenetelmät olivat esikuivaus ja maitohappobakteerisäilöntä ilmatäiviissä muovikelmussa sekä perinteinen pellolla kuivaksi kuivaus. Tarkastelukohteina olivat orgaanisen aineksen sisältämien pääravintoaineiden sekä kuidun ja epäorgaanisen fraktion makromineraalien Ca, P, Mg, K ja Na sekä mikromineraalien Co, Cu, Fe, Mn ja Zn pitoisuuksien muutokset rehujen kulkeutuessa hevosen ruuansulatuskanavan läpi. Karkearehua ja kauraa syötettiin samanaikaisesti, niiden yhteispitoisuus näkyi lannassa. Korsirehujen mineraalipitoisuudet olivat pääasiassa hyvin alhaiset, kaurassa ne olivat vertailutasolla kirjallisuuden kanssa. Lantanäytteiden mineraalipitoisuudet olivat pääasiassa korkeammat kuin korsirehujen, mutta alhaisemmat kuin kirjallisuudessa. Co-pitoisuus oli kaikissa näytteissä alle toteamisrajan.

Näytteistä määritettiin useita orgaanisia ravintoaineita. Näytteiden konaisrasvahappopitoisuuksiksi saatiin: säilöheinä (SH) $1,52 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$, kuivaheinä (KH) $169 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ ja kaura (K) $1,41 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ sekä säilöheinälanta (SH-lanta) $4,75 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ ja kuivaheinälanta (KH-lanta) $3,29 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$. Näytteissä oli liukoista sokereista glukoosia SH ($60 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$), KH ($60 \pm 30 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja kauralle ei saatu tulosta sekä SH-lanta ($0,46 \pm 0,08 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja KH-lanta ($0,35 \pm 0,12 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$). Raakaproteiinin pitoisuuksiksi saatiin SH ($70 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$), KH ($45 \pm 12 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja K ($135 \pm 15 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) sekä SH-lanta ($56 \pm 5 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja KH-lanta ($42 \pm 9 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$). Näytteet sisälsivät selluloosaa SH ($260 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$), KH ($293 \pm 7 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja K ($32 - 176$)* $\text{g kg}^{-1} \text{ ka}$ sekä SH-lanta ($250 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja KH-lanta ($290 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$). Kauran tulosarvio pohjautui artikkeliin 77. Näytteet sisälsivät hemiselluloosaa SH ($168 \pm 0 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$), KH ($168 \pm 13 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja K ($106 \pm 0 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) sekä SH-lanta ($185 \pm 11 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja KH-lanta ($186 \pm 13 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$).

ESIPUHE

Tämän päivän hevosharrastus nojautuu hyvin pitkälle tieteellisiin tutkimuksiin. Hevosammattilaiset ja miksei myös hevosharrastajat ovat kiinnostuneita hevosaiheisista tutkimuksista, joita kuitenkin on vain niukalti tarjolla yleiseen hyödyntämiseen. Omalta osaltani haluan pitkän linjan hevosharrastajana olla tutkimassa, miten paljon hevonen kykenee hyödyntämään ravintonsa sisältämiä ravintoaineita, sekä sisältääkö kotimainen rehu tarpeeksi ravinteita hevosen tarpeisiin. Hevosta pidetään huonona rehunkäyttäjänä, joten päätin ottaa asiasta selvää.

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella epäorgaanisen ja analyttisen sekä soveltavan kemian osastoilla, josta sain erittäin paljon tukea, apua ja hyviä neuvoja epävarmoissa tilanteissa. Erityiskiitos ohjaajilleni Rose Matilaiselle ja Jarmo Louhelaiselle. Lisäksi haluan kiittää ystäviäni ja kavereitani sekä etenkin omaa äitiäni ja veljiäni koko opiskeluajan tukemisesta: olette mahdollistaneet omalta osaltanne tämän viiden vuoden mittaisen seikkailun, jonka tuloksena on akateeminen koulutus ja uudet mahdollisuudet työelämässä.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	i
ESIPUHE.....	ii
SISÄLLYSLUETTELO.....	iii
KÄYTETYT LYHENTEET.....	vi
KIRJALLINEN OSA.....	1
1 JOHDANTO.....	1
2 KASVIRAVINNOSTA SAATAVIEN RAVINTOAINEIDEN KEMIA.....	2
2.1 Poolisten hiilihydraattien kemiallinen rakenne.....	2
2.2 Ligniinin (Fenoliset yksiköt) kemiallinen rakenne.....	7
2.3 Proteiinien monimutkainen kemiallinen rakenne.....	8
2.4 Poolittomien rasvahappojen kemiallinen rakenne.....	9
2.5 Kasvit sisältävät myös muita tärkeitä kemiallisia yhdisteitä.....	10
3 HEVONEN TARVITSEE MONEN TYYPPISIÄ RAVINTOAINEITA.....	10
3.1 Pääasiallisena energialähteenä ovat erilaiset hiilihydraatit.....	11
3.1.1 Helposti vapautuvaa energiaa NSC-ryhmän hiilihydraateista.....	11
3.1.2 Rakennehiilihydraateista hitaasti vapautuvaa energiaa.....	13
3.2 Hevonen tarvitsee proteiineja laaja-alaisesti.....	13
3.3 Rasvahapot taipuvat moneksi hevosen elimistössä.....	14
3.4 Makro- ja mikromineraalit ovat välttämättömiä myös hevoselle.....	15
3.5 Ruuansulatuskanava tarvitsee kuitua toimiakseen tasapainoisesti.....	16
4 TARJOLLA ON ERITYYPPISIÄ RAVINTOLÄHTEITÄ.....	17
4.1 Korsirehut ovat hevosen ensisijaisia ravintolähteitä.....	18
4.1.1 Kuivaheinä on perinteinen hevosten perusrehu.....	19
4.1.2 Esikuivattu säilöheinä on suosittu perusrehu.....	19
4.1.3 Laidunruoho maittaa hevoselle parhaiten.....	20
4.2 Väkirehut antavat tarvittaessa hevoselle lisäenergiaa.....	20
4.2.1 Viljat ovat perinteisiä hevosten väkirehujä.....	20
4.2.2 Teollisestituotetut väkirehut ovat syrjäyttämässä perinteiset väkirehut.....	22
4.3 Ruokavaliota voidaan tarvittaessa täydentää lisärehuilla.....	22
5 HEVOSEN LANTA PALJASTAA RAVINTOAINEPITOISUUKSIEN MUUTOKSET..	23
5.1 Hevosen ruokavalion laadulla on vaikutusta ruuansulatusaikaan.....	24
5.2 Hevosen käyttämä ruokavalio näkyy lannan koostumuksessa.....	25
6 ESIKÄSITTELYMENETELMÄT REHUANALYTIKASSA.....	26
6.1 Orgaanisten yhdisteiden erottelu Soxhlet -uuttamalla.....	26

6.1.1	Poolittomat rasvaliukoiset uuteaineet.....	27
6.1.2	Pooliset vesiliukoiset uuteaineet.....	27
6.2	Rikkihappohydrolyysi esikäsittelynä kokonaishiilihydraattien ja ligniinin määrityksessä.....	28
6.3	Kjeldahlin hajotus tyyppiyhdisteille.....	28
6.4	Mineraalien määritys mikroalouuniavusteista hajotusta apuna käyttäen.....	29
7	REHUANALYTIKASSA KÄYTETTÄVÄT TUTKIMUSMENETELMÄT.....	30
7.1	Kaasukromatografia helposti haihtuvien orgaanisten yhdisteiden analytiikassa.....	30
7.1.1	Vertailussa käytetään sisäistä standardia ja näytehavaintojen parantamisessa derivatisointia.....	31
7.1.2	Kaasukromatografian tekniikka lyhyesti.....	32
7.2	Tyyppipitoisuuden määrittäminen Kjeldahlin menetelmällä.....	33
7.3	Happoon liuenneen ligniinin määrittäminen UV-VIS-menetelmällä.....	34
7.4	Makro- ja mikromineraalien määrittäminen ICP-OES-menetelmää käyttäen.....	35
7.4.1	ICP-OES-laitteen toiminnan perusteet.....	35
7.4.2	Onnistunut mittaus ja kalibrointi.....	36
7.4.3	ICP-OES-tekniikka lyhyesti.....	37
8	TILASTOLLISET LASKENTAMENETELMÄT.....	38
	KOKEELLINEN OSA.....	41
9	TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT LAITTEET, REAGENSIT JA NÄYTTEET.....	41
9.1	Tutkimuksessa käytetyt laitteet.....	41
9.2	Tutkimuksessa käytetyt reagenssit.....	42
9.3	Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden taustatiedot.....	43
10	NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELY, ANALYSOINTI JA TULOKSET SEKÄ TULOSANALYYSI JA VERTAILU.....	44
10.1	Uuteaineiden määrittäminen liuotinuutolla.....	45
10.1.1	Uuteaineiden eristäminen Soxhlet -uuttomenetelmällä.....	45
10.1.1.1	Rasvaliukoiset uuteaineet.....	46
10.1.1.2	Vesiliukoiset uuteaineet.....	46
10.1.2	Uuteaineiden analysointi.....	47
10.1.3	Rasvahapot ja niiden pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	47
10.1.4	Liukoisten sokerien pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	51
10.2	Happohydrolyysillä erotellut fraktiot.....	54
10.2.1	Liukenemattoman ligniinin analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	56
10.2.2	ADL:n analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	58

10.2.3	Happohydrolyysillä pilkottujen hiilihydraattien analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	60
10.2.3.1	Hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	61
10.2.3.2	NDF- ja ADF-pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu.....	64
10.3	Raakaproteiinin määrittäminen Kjeldahlin menetelmällä.....	66
10.3.1	Näytteiden esikäsittely polttamalla sekä niiden neutralointi ja tislaukset.....	66
10.3.2	Typpipitoisuuden analysointi ja raakaproteiinin pitoisuuden laskeminen.....	67
10.3.3	Raakaproteiinin pitoisuuksien tulosanalyysi ja vertailu.....	68
10.4	Makro- ja mikromineraalien määrittäminen.....	70
10.4.1	Orgaanista ainesta sisältävien näytteiden esikäsittely mikroaaltouuniavusteisesti.....	70
10.4.2	Makro- ja mikromineraalien analysointi ja tulokset.....	71
10.4.2.1	Kalibrointi ja siitä saadut arvot.....	72
10.4.2.2	Näytteiden sisältämät mineraalipitoisuudet.....	73
10.4.3	Näytteiden mineraalipitoisuuksien tulosanalyysi ja vertailu.....	74
11	YHTEENVETO.....	76
	KIRJALLISUUSLUETTELO.....	79
	LIITTEET.....	86

KÄYTETYT LYHENTEET

ADF	(Acid detergent fiber)	=	Happoon liuennut kuitu
ADL	(Acid detergent lignin)	=	Happoon liuennut ligniini
BSTFE	(Bis(trimethylsilyl)trifluoroasetamide)	=	Bis(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidi
FID	(Flame ionization detector)	=	Liekki-ionisaatio ilmaisin
GC	(Gas chromatography)	=	Kaasukromatografia
GI -kanava	(Gastric intestine)	=	Ruuansulatuskanava
HOMO	(The highest occupied molecular orbital)	=	Korkein varattu molekyyliorbitaali
ICP-OES	(Inductively coupled plasma-Optical emission spectrometry)	=	Induktiivisesti kytketty plasma-optinen emissio spektrometria
LOD	(Limited of detection)	=	Toteamisraja
LOQ	(Limited of quatification)	=	Määrittäysraja
LUMO	(The lowest unoccupied molecular orbital)	=	Alhaisin varaamaton molekyyliorbitaali
MTT		=	Maatalouden tutkimuslaitos, Luonnonvarakeskus (LuKe)
MSD	(Mass selective detector)	=	Massaselektiivinen detektori
NDF	(Neutral detergent fiber)	=	Sulamaton kuitu
NSC	(Non-soluble carbohydrate)	=	Rakenteelliset hiilihydraatit
RF	(Radio frequency)	=	Radiotaajuus
TMCS	(Trimethylchlorosilane)	=	Trimetyylikloorisilaani
UHQ-vesi	(Ultra high quality)	=	Ultrapuhdas vesi
UV-VIS	(Ultraviolet-visible spectrometry)	=	Ultravioletti-näkyvä valo spektrometri

WSC (Water soluble carbohydrate) = Vesiliukoiset hiilihydraatit

KIRJALLINEN OSA

1 JOHDANTO

Hevoset ovat pääasiassa suurikokoisia herbivorisia nisäkkäitä, joita ihminen kasvattaa lähinnä omiin vapaa-ajantarpeisiinsa. Lisäksi luonnosta löytyy joitain villihevosrotuja, ne ovat sitten asia erikseen. Hevosen ylläpito on kallista, jo pelkästään sen perusravintokustannukset lohkaisevat suuren osan sen ylläpitokustannuksista. Eläimet eivät käytä ruokansa ravintoaineita ja ravinteita 100 prosenttisesti hyväkseen.¹ Tiedetään, että hevonen käyttää ravintonsa sisältämistä ravintoaineista vain osan, siksi hevosen on käytettävä huomattavastikin enemmän aikaa² syömiseen kuin esimerkiksi nautaeläimien. Hevosella ei ole pötsiä kuten nautaeläimillä, mikä vaikeuttaa kasviraivannon tarkemman hyödyntämisen. Pötsin avulla nautaeläimet kykenevät hyödyntämään ravintonsa paremmin kuin hevoset, muun muassa hajottamalla kasvisoluseinän perusteellisemmin kuin hevosen ruuansulatuselimistö. Nautojen ja hevosten kuidun sulattamista vertailevassa tutkimuksessaan saatiin tulokseksi, että koeryhmän naudat sulattivat 28 – 83 % enemmän sulamatonta kuitua (NDF) sekä happoon liuennutta kuitua (ADF) kuin hevoset.³ Tämä osoittaa hevosen ruuansulatuskanavan vajavaisuuden. Hevosen ruuansulatusjärjestelmä on rakentunut niin, että se kykenee käsittelemään rehua vain pieniä eriä kerrallaan. Se vaatii myös, että rehua annostellaan usein. Pitää muistaa, että kyseessä on suurikokoinen eläin, joka vaatii kohtuullisen paljon energiaa elintoimintoihinsa. Hevosen ruuansulatuskanavan toiminnan haasteena on käyttää hyödykseen ruohokasvien sisältämiä kuiturakenteita.² Hevosen ruuansulatus on ainutlaatuinen ja ehkä herkempi häiriöille kuin useiden muiden eläinten.⁴ Hevosen ruuansulatusjärjestelmän heikkous on kehittynyt todennäköisesti pikkuhiljaa, kun ihminen on kesyttänyt ja jalostanut hevosta vuosisatojen aikana villihevosesta aina yhä jalostetummaksi ihmisen palvelijaksi. Muutokset hevosen suoliston mikro-organismeissa kertovat siitä, että niiden ekosysteemissä on tapahtunut ruokinnasta johtuva muutos, mikä on osaltaan vaikuttanut koko suolen toimintaan.⁴

Tässä pro gradu -tutkielman teoriaosassa käydään läpi hevoselle tärkeitä ravintoaineita, niiden kemiaa sekä joitain tärkeimpiä rehuja. Kokeellisessa osassa tutkitaan Suomessa asuville keskivertohevosille syötettävän rehun sisältämien ravintoaineiden ja ravinteiden pitoisuuksien muutoksia, kun ravinto kulkeutuu hevosten ruuansulatuskanavan läpi. Tutkielmassa analysoidaan sekä ravinnon että lannan sisältämät ravintoaineet ja hevoselle tärkeät ravinteet. Vertailemalla tuloksia havainnoidaan pitoisuuksien muutokset.

2 KASVIRAVINNOSTA SAATAVIEN RAVINTOAINEIDEN KEMIA

Kasviaines sisältää sekä orgaanista että epäorgaanista ainesta. Orgaaninen aines sisältää erilaisia hiiliyhdisteitä, jotka palavat tuottaen hiilidioksidia (CO_2) ja vettä (H_2O). Eliöt hyödyntävät orgaanisia yhdisteitä elintoimintoihinsa syömällä kasviravintoa. Erilaiset kasvisolujen tuottamat yhdisteet voidaan pilkkoa joko pienemmiksi yksiköiksi tai hyödyntää sellaisenaan riippuen yhdisteestä. Orgaanisten yhdisteiden luokittelussa voidaan käyttää useitakin luokittelutapoja. Yleisimpiä kemiallisia luokittelutapoja on jakaa yhdisteet poolisiin ja poolittomiin yhdisteisiin tai luokitella ne niiden sisältämien funktionaalisten ryhmien perusteella. Funktionaaliset ryhmät tuottavat yhdisteelle tyypilliset ominaisuudet, kuten reaktiokäyttäytymisen tai yhdisteelle tyypillisen hajun tai tuoksun. Erilaisten orgaanisten yhdisteryhmien havainnollistamiseksi, jokaisesta ryhmästä kertovan kappaleen lopuksi, on esitetty yhdisteryhmästä havaintokuva, jossa esitetään ryhmälle tyypillinen tai eksakti rakennekaava tai -kaavoja. Kaikki rakennekaavat on piirretty ChemSketch -piirtämisohjelmaa käyttäen.

Epäorgaaninen aines jää jäljelle, kun orgaanista ainesta sisältävä näyte poltetaan. Epäorgaaninen aines (tuhka) sisältää pääasiassa erilaisia metalliatomeja, mutta myös epämetalleja sekä epäorgaanisia yhdisteitä kuten silikaatteja.

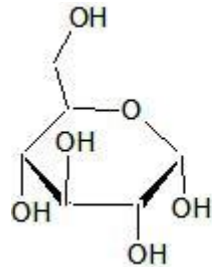
2.1 Poolisten hiilihydraattien kemiallinen rakenne

Kasvit sisältävät runsaan määrän erilaisia hiilihydraatteja. Ne ovat kaikki erittäin hydrofiilisiä yhdisteitä, koska ne sisältävät useita hydroksyyli ryhmiä (-OH). Lisäksi jotkut yksiköt voivat sisältää myös muita hydrofiilisiä funktionaalisia ryhmiä, kuten karboksyylihapporyhmän (-COOH). Hiilihydraatteja löytyy polymeerirakenteina soluseinän rakenteista ja energiavarastoista sekä pienempinä molekyyleinä mono-, di- ja oligosakkarideina.^{5b)}

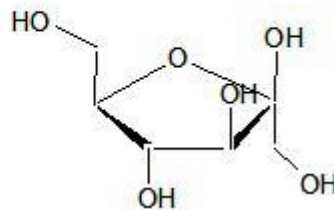
Kasvisolujen yhteyttämistuotteena syntyvä monosakkaridi, glukoosi, on rakenteeltaan aldoheksaosi ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Se esiintyy kasvisoluissa mieluiten rengasrakenteisessa pyranoosimuodossa, mutta voi myös esiintyä avoketjuisena. Fruktuosi on myös monosakkaridi, joka on muokattu entsyymaattisesti glukoosista. Sen molekyylikaava on sama kuin glukoosin. Glukoosi ja fruktuosi eroavat rakenteeltaan, sillä glukoosin sisältämä karbonyyli ryhmä sijaitsee avoketjuisessa rakenteessa ensimmäisessä hiilessä. Vastaavasti fruktuosin karbonyyli ryhmä sijaitsee toisessa hiilessä. Karbonyyli ryhmän paikan perusteella fruktuosin rakenne on ketoheksaosi. Se esiintyy myös

miehellään rengasrakenteena. Tätä rengasrakennetta kutsutaan fruktofuranoksi. Sekä glukoosi että fruktoosi esiintyvät kasvisoluissa D-enantiomeereinä.^{5b)} Kuvassa 1 on esitetty monosakkaridien glukoosin ja fruktoosin rakennekaavat.

a) Glukoosi

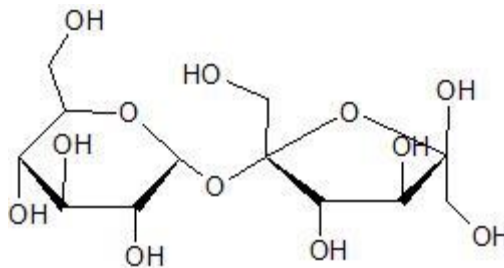


b) Fruktoosi



Kuva 1. a) glukoosin rakennekaava ja b) fruktoosin rakennekaava.

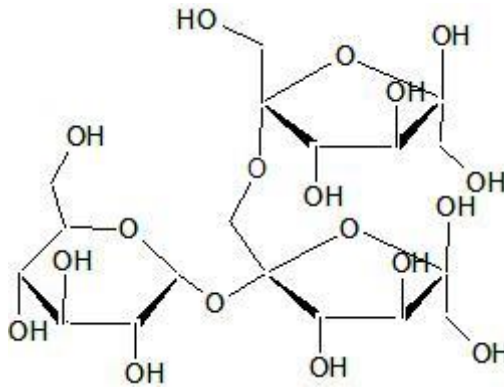
Kasvisolussa muodostettava disakkaridi, sakkaroosi, rakennetaan entsymaattisesti glukoosista ja fruktoosista. Tällöin glukoosi on α -muodossa (α -D-glukopyranoosi) ja fruktoosi β -muodossa (β -D-fruktofuranooosi). Tällöin sakkariidien välille muodostuu (β 1 \rightarrow α 4)-glykosidisidos.^{5b)} Kuvassa 2 on esitetty sakkaroosin rakennekaava.



Kuva 2. Sakkaroosin rakennekaava.

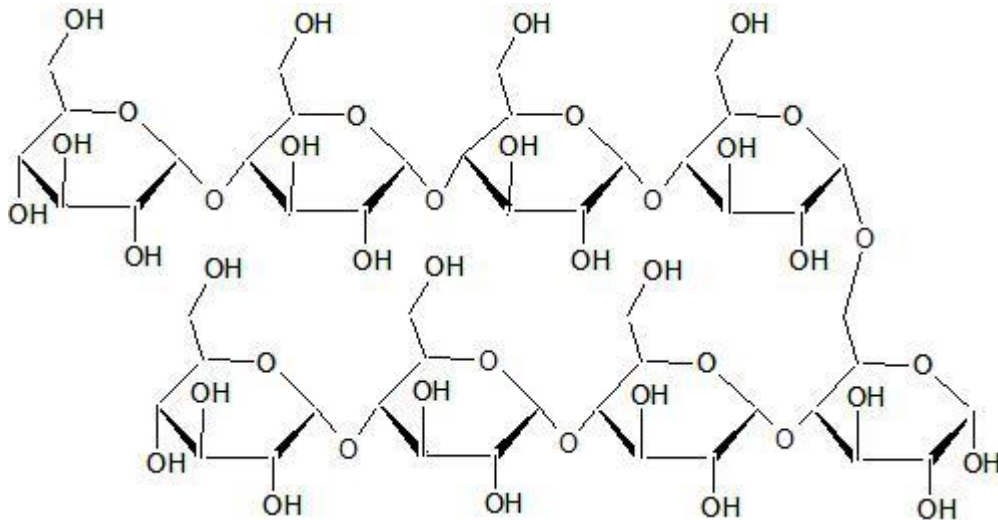
Heinäkasvit varastoivat energiaa fruktaaneina. Tri-, oligo- ja polyfruktaanit ovat varastohiilihydraatteja, jotka koostuvat lähinnä fruktoosisista. Niiden entsymaattinen rakentaminen aloitetaan aina sakkaroosista. Sakkaroosin fruktoositähteeseen lisätään entsymaattisesti yksittäisiä fruktoosimolekyylejä glykosidisidoksella.⁶ Pohjolassa kasvatettavassa Timotei -heinässä (*Pheleum*

pratence) esiintyvät fruktaanit sitoutuvat joko levaani tai inuliini muotoisesti C-6 tai C-1 sijaitsevien hydroksyyliiryhmien kautta. Tällöin muodostuu levaaniryhmään kuuluva β -D-2,6-glykosididos tai inuliiniryhmään kuuluva β -D-2,1-glykosididos.⁷ Heinäkasveissa esiintyy myös haaroittuneita fruktaaneja. Tällöin polymeerissä voi esiintyä molempia sitoutumismuotoja, joista toista pääketjussa ja toista sivuketjussa.⁸ Kuvassa 3 on esitetty yksinkertaisimman fruktaanin 1-kestoosin rakennekaava, joka on muodostunut kolmesta monomeerista.



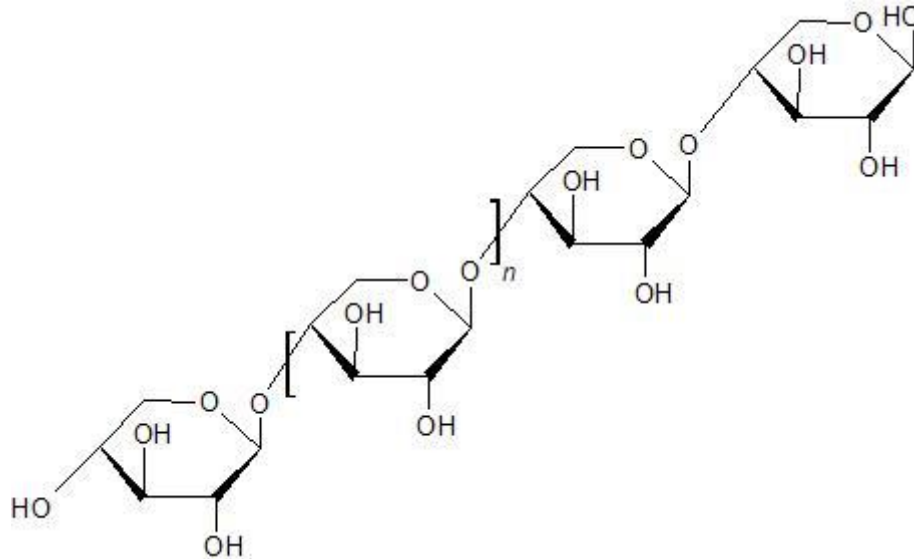
Kuva 3. Yksinkertainen fruktaani1-kestoosi: sakkaroosin ja yhden fruktoosin muodostama inuliini muotoisesti β -D-2,1-glykosididosella sitoutunut varastosokeri.

Monet kasvit rakentavat energiavarastoja glukoosista. Viljakasvit varastoivat energiaa glukoosin polymeeriseen muotoon eli tärkkelykseksi tähkän siemeniin. Tärkkelyksestä muodostetaan tärkkelysjiyväsiä, jotka sisältävät myös muita yhdisteitä kuin glukoosipolymeeriä. Tärkkelys koostuu lineaarisesta amyloosista ja haaroittuneesta amylopektiinistä. Linearisessa amyloosissa glukopyranoositähteet sitoutuvat $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosididosella polysakkaridiketjuksi. Amylopektiinissä amyloosin kaltaiseen lineaariseen rakenteeseen muodostuu joka 24. tai 36. pyranoositähteeseen toinen glykosididos. Haarautumiskohtaan muodostuu $\alpha(1\rightarrow6)$ -glykosididos, josta lähtee sakkariidisivuhaara.^{9a)} Kuvassa 4 on esitetty tärkkelyksen rakennekaava. Kuvassa on sekä lineaarista rakennetta että haaroittunut osa.



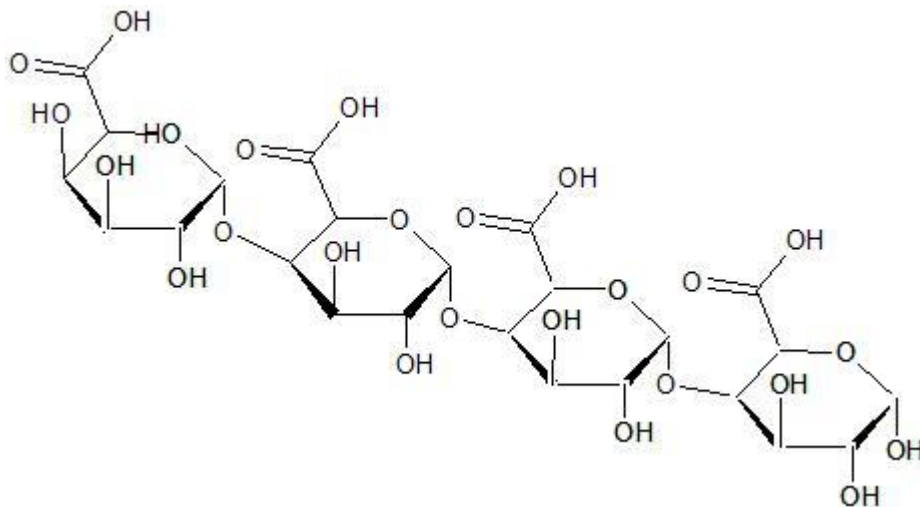
Kuva 4. Tärkkelyksen rakennekaava: Ylä- ja alarivissä lineaarisiksi $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidisidoksella rakentunutta polysakkaridiketjua ja ylä- ja alarivin yhdistävä kohta $\alpha(1\rightarrow6)$ -glykosidisidos.

Hiilihydraatteja esiintyy lisäksi polymeerirakenteina kasvisolun soluseinän osana hemiselluloosassa ja selluloosassa. Lisäksi soluseinässä esiintyvä pektiini kuuluu hiilihydraattipolymeereihin.¹⁰ Hemiselluloosa on vesi- ja emäsluokoinen kasvin primäärinen soluseinän osa. Siinä esiintyy pentoosirakenteisia hiilihydraattimonomeereja, jotka sisältävät viisi hiiltä. Ne ovat ksyloosi ja arabinoosi. Hemiselluloosa sisältää myös heksoosirakenteisia monomeereja, joita ovat glukoosi, mannoosi ja galaktoosi. Heinäkasvien hemiselluloosassa esiintyy eniten ksyloosimonomeereja. Rakenteessa on lisäksi sakkaridirakenteen sisältäviä yhdisteitä, joita ovat glukuronihappo, metyyli-glukuronihappo, galakturonihappo/uronihappo ja ramnoosi. Hemiselluloosan sisältämä hiilihydraattipolymeerirakenne voi olla lineaarista tai haaroittunutta kuten tärkkelyksen glukoosipolymeerirakenne. Monomeerit, jotka sijaitsevat lineaarisessa osassa, kuten mannoosi, voivat vetysitoutua selluloosan pinnan kuidun kanssa. Haaroittuneiden kohtien monomeerit, kuten arabinoosi ja uronihappo, pystyvät muodostamaan kovalenttisen sidoksen ligniinin kanssa. Ligniinin ja hemiselluloosan muodostama ristsidosverkko on erittäin tiivis, joka estää jopa hevosen hajottavien ruuansulatusentsyymien tunkeutumisen rakenteeseen.¹¹ Kuvassa 5 on esitetty heinän primaarisoluseinässä eniten esiintyvän aldopentoosi ksyloosin (n) rakennekaava sekä sen homogeeninen polymeerirakenne ksyylaani.



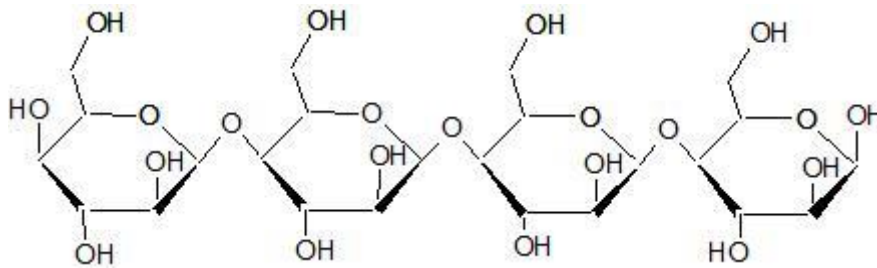
Kuva 5. Heinän primaarisoluseinässä eniten esiintyvää ksylaanihemiselluloosaa, joka rakentuu ksyloosimonomeereistä (merkitty n).

Pektiini on vesiliukoinen hiilihydraattipolymeerirakenne. Se tukee hemiselluloosaa ja selluloosaa soluseinän primäärirakenteessa. Sitä ei ole sekundäärisessä soluseinärakenteessa lainkaan. Pektiinin monomeerina on α -D-galakturonihappo. Monomeerit sitoutuvat lineaarisesti α -D-(1,4)-glykosididisidoksella. Lineaaristen rakenteiden lisäksi pektiinää on myös haaroittunutta muotoa, jossa esiintyy myös aldehydi- ja ketoryhmiä.¹² Kuvassa 6 on esitetty pektiinin rakennekaava.



Kuva 6. Pektiinin rakennekaava.

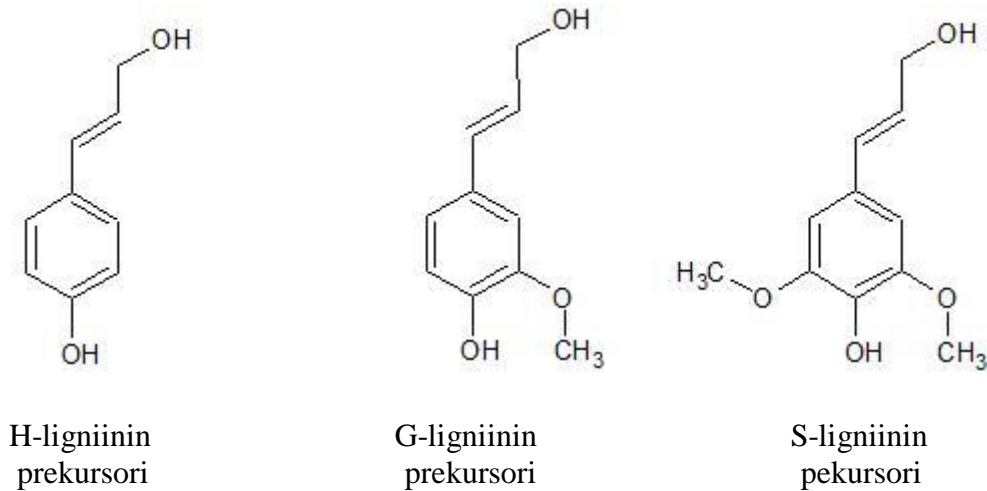
Selluloosa on lineaarisesti rakentunut homopolysakkaridi. Sen perusyksikkö on β -D-glukopyranoosi. Perusyksiköt sitoutuvat (β 1 \rightarrow 4)-glykosididoksella lineaarisesti. Lineaariset polymeeriketjut muodostavat vetysidoksia keskenään ja järjestäytyvät säiekimpuiksi, jotka kasaantuvat yhä suuremmiksi rakenteiksi. Nämä selluloosan järjestäytyneet molekyylit voivat muodostaa kiteisiä tai amorfisia osia selluloosarakenteeseen. Selluloosasta suurin osa on kiteistä rakennetta. Kiteinen rakenne ligniinin kanssa luo lujan makroskooppisen lignoselluloosarakenteen.¹² Kuvassa 7 on esitetty selluloosan rakennekaava.



Kuva 7. Selluloosan rakennekaava.

2.2 Ligniinin (Fenoliset yksiköt) kemiallinen rakenne

Ligniini ei ole varsinaisesti kasvinsyöjien ravintoaine, mutta se on oleellinen osa kasvia. Se vaikuttaa oleellisesti herbivoristen eläinten ravinnon hyödyntämiseen, sillä mitä enemmän ligniiniä ravinto sisältää sitä heikommin muun muassa hevonen kykenee hyödyntämään sitä ravintonaan. Fenolisten yksiköiden muodostamaa amorfista verkkoainesta esiintyy vain sekundaarisessa soluseinässä. Mitä pidemmälle kasvin kasvu (heinien korsiantuminen) on edennyt sitä enemmän se sisältää ligniiniä ja sulamatonta vettä hylkivää ja entsyymien läpäisemätöntä kuitua. Fenoliset yksiköt sisältävät aromaattisen renkaan, mikä tekee niistä suhteellisen hydrofobisia. Ligniinin rakenneyksiköt sitoutuvat keskenään ristsidoksin, mikä luo kestävä ja vaikeasti hajotettavan rakenteen. Lisäksi rakenneyksiköiden substituentit sitoutuvat hemiselluloosan sisältämien hiilihydraattimonomeerien kanssa glykosidi-, esteri- ja eetterisidoksilla. Heinäkasvien ligniini koostuu G-, S- ja H-yksiköistä (guajasyyli, syringyyli ja *para*-hydroksifenylyli). Fenolihapot (ferula- ja kumarihappo) sitoutuvat hemiselluloosan hiilihydraattipolymeereihin ristsidoksilla, mikä tiivistää soluseinärakennetta entisestään.¹⁰ Kasvisolut muodostavat monimutkaisia ligniimirakenteita radikaalireaktiolla, lähtöaineina käytetään prekursoreita.¹³ Kuvassa 8 on esitetty heinän sisältämän ligniinin lähtöaineena toimivien prekursorien rakennekaavat.



Kuva 8. Heinäkasvien ligniinin prekursorirakenneyksiköitä.

2.3 Proteiinien monimutkainen kemiallinen rakenne

Kasvit sisältävät proteiinia suhteessa vähemmän kuin hiilihydraatteja. Proteiinerakenteita kasvisolut tarvitsevat samalla tavalla solutoiminnassaan kuin eläinsolut. Proteiinien perusyksikkö on aminohappo. Aminohappo sisältää perusrungon, jossa on kaksi funktionaalista ryhmää, amino- ($-\text{NH}_3$) ja karboksyylihapporyhmä. Fysiologisessa pH:ssa (7,4) aminohapot esiintyvät kahtaisionina, eli molemmat funktionaaliset ryhmät ovat varautuneina, jolloin ne voivat tarvittaessa vastaanottaa vety-ionin. Aminohapot sitoutuvat keskenään peptidisidoksella (amidisidoksella) niin, että karboksyylihapporyhmä sitoutuu toisen aminohapon aminoryhmän kanssa. Tätä ketjurakennetta kutsutaan primaarirakenteeksi. Aminohapot voivat muodostaa erittäin pitkiä polypeptidiketjuja, mitkä sinällään eivät vielä ole toiminnallisia proteiineja.^{14a)} Lisäksi aminohapot sisältävät sivuketjun, kuitenkin poikkeuksena on yksi aminohappo, joka on glysiini. Glysiiniä lukuun ottamatta, kaikkien muiden aminohappojen pääketjun α -hiili on kiraalinen, eli kaikki siihen sitoutuneet substituentit ovat erilaisia. Lisäksi loppujen 19 välttämättömän aminohapon sivuketjun sisältämät atomit ja funktionaaliset ryhmät määrittelevät aminohapon luokitusryhmän. Luokitusryhmiä voivat olla esimerkiksi rikkihappoiset, happamat, emäksiset, hydrofiiliset neutraalit ja hydrofobiset aminohapot. Aminohappojen sisältämät atomit ja funktionaaliset ryhmät muodostavat sitoutuessaan sekundaarisen ja tertiaarisen rakenteen. Tällöin sivuketjujen välille muodostuu vetysitoutumisia, hydrofobisia vuorovaikutuksia, suolasiltoja sekä rikkisiltoja. Sidoksen tai vuorovaikutuksen tyyppi riippuu siitä, mikä atomi tai funktionaalinen ryhmä on kyseessä.^{5a)} Kuvassa

9 on esitetty kolme erityyppistä aminohappoa. Niiden sivuketjut ovat erilaiset, joiden ansiosta niiden sekundaariset ja tertiaariset sitoutumiset ovat hyvin erilaiset.

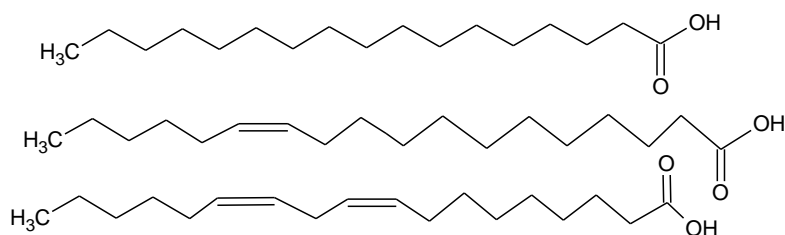


Kuva 9. Joidenkin aminohappojen rakennekaavat: a) Yksinkertainen glysiini b) hapan asparagiinihappo ja c) rikkipitoinen kysteiini.

2.4 Poolittomien rasvahappojen kemiallinen rakenne

Kasvisoluissa rasvahapot tuotetaan itse. Lähtöaineena on glukoosi. Pääasiassa rasvahapot tuotetaan solun kalvorakenteisiin, mutta niitä esiintyy myös vapaana. Yleensä rasvahappo kostuu pitkistä alifaattisesta hiilivetyketjusta sekä sen toisessa päässä sijaitsevasta karboksyylihapporyhmästä (-COOH). Kasvisolut sisältävät myös lyhytketjuisia helposti haihtuvia rasvahappoja. Rasvahapot voivat esteröityä alkoholien tai fosfaatti-ionien kanssa muodostaen esterisidoksen. Fosfaatti on yleensä esteröitynyt alkoholin kanssa. Tällöin rasvahappo on edelleen ulospäin varaukseltaan neutraali. Kyseessä olevan molekyylin poolisuus on todennäköisesti aivan eri kuin vapaan rasvahapon. Tällöin myös sen kemiallinen käyttäytyminen on erilainen.^{5c)} Rasvahapot voivat olla tyydyttyneitä, tyydyttymättömiä tai monitydyttymättömiä. Tyydyttymättömät rasvahapot sisältävät yhden hiili-hiili kaksoissidoksen ja monitydyttymättömät sisältävät niitä useita. Tyydyttyneet rasvahapot eivät sisällä hiili-hiili kaksoissidoksia ollenkaan.^{15b)} Luonnossa esiintyvillä tyydyttymättömällä rasvahapoilla hiili-hiili kaksoissidoksella on aina tietty paikka. Se ei voi esiintyä satunnaisesti missä vaan. Paikkoina voivat olla hiili-hiili sidos 3, 6, 9, 12 ja 15. Sidos lasketaan ei-happoryhmä päästä alkaen. Esimerkkinä α -linoleenihappo, jossa on kaksoissidos sidoksissa 9, 12 ja 15. Tämän yksi merkintätapa on $\Delta^{9,12,15}$. Rasvat ovat poolittomia pitkän hiili-vety-rakenteensa ansiosta. Vaikka ne sisältävät poolisen karboksyylihapporyhmän, on sen vaikutus heikko suhteessa pitkään hiili-vetyketjuun nähden.^{5c)} Kuvassa 10 on esitetty eri tyydyttyneisyysasteen rasvahapot,

joiden hiili-vety-ketju on samanmittainen, 18 hiiltä. Kuva havainnollistaa rakenteiden eroavaisuudet.



Kuva 10. Eri tyydyttyneisyysasteen rasvahappojen rakennekaavat: ylin tyydyttynyt steariinihappo (C18:0), keskellä tyydyttymätön öljyhappo (C18:1) ja alinna monitydyttymätön linolihappo (C18:2).

2.5 Kasvit sisältävät myös muita tärkeitä kemiallisia yhdisteitä

Kasvit sisältävät myös muita tärkeitä orgaanisia yhdisteitä omien solutoimintojen ja kasvun takaamiseksi kuten vesiliukoisia ja rasvaliukoisia vitamiineja, hartseja, pigmenttejä ja tanniineja.¹⁶ Ne saadaan eristettyä näytteestä erilaisilla liuottimilla, riippuen, onko kyseessä poolinen tai pooliton yhdisteryhmä. Osalle edellä mainituista yhdisteryhmistä on myös positiivista hyötyä kasvia syöville eläimille, kuten vitamiineilla ja tanniineilla. B-vitamiinit (B₁ ja B₂) toimivat ko-faktoreina osana koentsyymiä hapetus-pelkistys -reaktioissa.^{15a)} Vastaavasti C-vitamiini toimii yleisantioksidanttina.^{14b)} Tanniineihin luettavat flavonoidit ovat kasvien tuottamia fenolisia uuteaineita. Useimmat tanniinit reagoivat siten, että reaktion seurauksena muodostuu radikaaleja, joilla on bakteereja tuhoava vaikutus.^{9c)}

3 HEVONEN TARVITSEE MONEN TYYPPISIÄ RAVINTOAINEITA

Heinäanalyysi on ainoa keino määrittää hevoselle tarjottavan korsirehun kemiallinen koostumus.¹⁷ Kemiallisen koostumuksen määrittäminen voidaan myös tehdä väkirehuille, esimerkiksi viljoille. Teollisesti tuotettujen väkirehujen pakkaukset sisältävät aina niiden kemiallisen koostumuksen sekä rehun sisältämän keskimääräisen energiamäärän. Hevosen ravinnontarpeen tyydyttäminen riippuu paitsi syöntimäärästä, myös rehun sulavuudesta ja ravintoainesisällöstä.¹⁸ Karkearehun sulavuudella on erittäin tärkeä merkitys, koska se kuvaa kokonaisvaltaisesti rehun sisältämän sulavan aineksen

osuutta. Se on sulavan orgaanisen aineksen osuus kuiva-aineksessa, jota suolisto pystyy sulattamaan.¹⁸ Orgaanisen aineksen sulavuutta voidaan arvioida monilla erilaisilla menetelmillä. Käytettävissä on kemiallisia, biologisia ja fysikaalisia menetelmiä.¹⁹ Analyysihin pohjautuen voidaan rakentaa hevosityksilölle sen tarpeita vaativa ruokavalio. Heinäanalyysin antaman tiedon perusteella voidaan arvioida tarvittaessa väkirehun tarve.¹⁷

Heinän kemiallinen koostumus voidaan määrittää hyvinkin tarkasti. Kuitenkaan ei ole mielekästä analysoida kaikkia rehun sisältämiä yhdisteitä, vaan jakaa yhdisteet siten, että analysoidulla yhdisteryhmällä on ravitsemuksellinen merkitys hevoselle.

Hevonen koostuu monen tyyppisistä elimistä, jotka rakentuvat erityyppisistä eläinsoluista. Jotta solut pystyvät ylläpitämään elämää, ne tarvitsevat erityyppisiä yhdisteitä ja atomeita toimintaansa varten. Monilla ravintoaineilla on monta funktiota. Erityyppisiä yhdisteitä voidaan käyttää erityyppisiin tarpeisiin, esimerkiksi energiaa saadaan tarvittaessa muustakin kuin hiilihydraateista.

3.1 Pääasiallisena energialähteenä ovat erilaiset hiilihydraatit

Suurin osa hevosen ravinnosta koostuu hiilihydraateista. Hevonen saa pääasiassa energiansa ravintonsa sisältämistä erityyppisistä hiilihydraateista. Hiilihydraatit voidaan jakaa kahteen tyyppiin rakenteellisiin ja liukeneviin hiilihydraatteihin (NSC). Rakenteelliset hiilihydraatit ovat lähinnä kuitua ja ei-rakenteelliset niin kutsuttuja sokereita ja tärkkelystä. Kuitu koostuu erityyppisistä polysakkaridi rakenteista: hemiselluloosasta, pektiinistä ja selluloosasta.²⁰ NSC -ryhmä koostuu erityyppisistä hiilihydraateista, joita ovat sokerialkoholit (esim. sorbitoli), monosakkaridit (esim. glukoosi ja fruktoosi), disakkaridit (esim. sukroosi), oligosakkaridit (esim. raffinoosi) ja polysakkaridit (tärkkelys ja polyfruktaanit). Hevonen kykenee käyttämään energianlähteenään glukoosi ja fruktoosi molekyylejä sekä niiden erityyppisiä polymeerejä. Näitä hiilihydraattipolymeerejä ovat hemiselluloosa ja selluloosa, tärkkelys, pektiini ja fruktaanit. Hiilihydraattien sisältämä energiaa vapautuu, kun molekyyliä pilkotaan. Mitä suurempi makroskooppinen hiilihydraattimolekyyli, sitä hitaammin siitä vapautuu energiaa.²¹

3.1.1 Helposti vapautuvaa energiaa NSC-ryhmän hiilihydraateista

Kasvisolun sokerit kuuluvat liukeneviin NSC-ryhmän hiilihydraatteihin. Sulattaessaan ravintoansa saa hevonen sokerifraktiosta helposti ja nopeasti energiaa käyttöönsä, sillä liukoiset sokerit ovat

hampailla murskatussa ruokamassassa helposti hyödynnettävissä. Yleensä nämä niin kutsutut sokerit esiintyvät hyvin lyhytketjuisina (mono, di ja oligo) sakkarideina. Nämä kaikki kasveissa esiintyvät NSC-molekyylit refleктоivat kasvin kasvua ja fotosynteesiä sekä abiottista stressiä. Ne tarjoavat kasville energiaa itämiseen ja kasvuun. NSC-molekyyleja esiintyy tällöin eniten siemenissä, lehdistä sekä juurissa.²¹ Hevonen ei syö juuria. Viljakasvien siemeniä hevonen syö vasta tähkän tuleentumisen jälkeen, kun viljakasvin energiavarastot ovat saavuttaneet täydellisen polymeerisen rakenteen. Joten hevonen ei hyödynnä viljakasvien siemenien runsasta NSC-määrää. Hevonen hyödyntää heinäkasvien lehtien runsasta NSC:n määrää sekä syödessään kasvavalla laitumella että aikaisessa ja normaalissa vaiheessa korjatussa karkearehussa. Kun karkearehu sisältää runsaasti NSC-molekyylejä, rehu tuoksuu makealta. Nämä ei-rakenteelliset hiilihydraatit liukenevat myös helposti veteen (WSC). Se voidaan havaita, kun esimerkiksi korsirehua liotetaan (uutetaan) kylmässä vedessä. Veden väri muuttuu kohtuullisen nopeasti ruskeaksi. Lisäksi vesi tuoksuu makealta. Tällä menetelmällä voidaan tarvittaessa vähentää jonkin verran erittäin sokeripitoisen rehun liukoisten sokerien määrää.

Monosakkarideja, glukoosia ja fruktoosia, esiintyy heinäkasveissa kohtuullisen paljon. Lisäksi heinissä esiintyy disakkaridia, sakkaroosia, sekä oligosakkarideina ja polysakkarideina fruktaaneja. Fruktaanit ovat vaskulaarikasvien varastosokereita. Fruktaaneja esiintyy sekä heinäkasveissa että viljoissa. Fruktaanivarastojen rakentaminen joissain kasveissa voi jatkua, vaikka ilman lämpötila laskisi lähelle nollaa.²² Sakkaroosin ylituotannon seurauksena, lauhkeiden alueiden heinäkasveilla, fruktaanisynteesi voi käynnistyä, vaikka kasvi altistuu alhaisille lämpötiloille.²³ Toisin sanoen, sakkaroosisynteesi säätelee myös fruktaanisynteesiä. Fruktaanit ovat fruktoosin polymeerirakenteita, jotka voivat olla rakenteeltaan joko lineaarisia tai haarottuneita. Tunnusomaista on, että lyhytketjuiset fruktaanit maistuvat makealta ja pitkäketjuiset neutraalilta.²⁴ Oli fruktaanien koko mikä tahansa, niiden määrää rehussa ei kuitenkaan voida arvioida ilman rehuanalyysiä.

Tärkkelystä hevonen saa pääasiassa väkirehuista, lähinnä viljoista. Hevoselle annettavien eri viljalajien, kauran, ohran ja maissin tärkkelyspitoisuudet vaihtelevat 40 – 70 % välillä. Kauran tärkkelyspitoisuus on niistä alhaisin, se on 40 %.²⁵ Ruotsalaisen kauran eri variaatioiden tärkkelyspitoisuuksiksi on tutkimuksessa saatu keskimäärin 46,2 %.²⁶ Tulos on samaa luokkaa, mitä suomalaiselle kauralle ilmoitetaan. Tulokset ovat hyvinkin perusteltua, koska maamme sijaitsevat maapallon samoilla leveysasteilla. Molemmissa maissa auringon valon määrä ja lämpötilat ovat lähes samat. Tärkkelys on hyvin kompaktissa muodossa olevaa lisäenergiaa, jota annostellaan huomattavasti vähäisempiä määriä kuin karkearehua. Tärkkelystä sisältäviä väkirehuja annetaan

hevoselle lisääntyneeseen energiantarpeeseen, kun sille annettavan karkearehun energiasisältö ei vastaa tarvetta.

3.1.2 Rakennehiilihydraateista hitaasti vapautuvaa energiaa

Heinän soluseinä, joka koostuu selluloosakuidusta, on upotettu amorfiseen seokseen. Seos koostuu hemiselluloosasta, pektiinistä, ligniinistä ja glykoproteiineista sekä vähäisemmästä määrästä tärkkelystä ja piitä.²⁷ Kasvisolussa hiilihydraateilla on rakenteellinen funktio. Rakenteellisia hiilihydraattipolymeerirakenteita ovat soluseinän hemiselluloosa, selluloosa ja pektiini.

Hemiselluloosafraktio on ryhmä soluseinäpolysakkarideja, jotka ovat yksi kolmasosa kaikista käytössä olevista komponenteista lauhkean alueen heinäkasveissa.²⁸ Se kuvastaa hemiselluloosaan käytettävien hiilihydraattien määrää ja merkitystä. Heinäkasvit käyttävät runsaasti erityyppisiä hiilihydraattiyhdisteitä sekä rakenteessaan että omien energiaa tarvitsevien toimintojensa takaamiseksi.

Xu *et al.*²⁷ ovat tutkineet Suomessakin hevosille syötettävän englannin raiheinän (*Lolium perenne*) lehtien sisältämien kasvisolujen rakentaman hemiselluloosan liukoisuutta sekä liuottamalla sitä vedellä ja natriumhydroksidilla. Tulokseksi he saivat, että 8,4 % kuivien raiheinälehtien määrästä on vesiliukoista hemiselluloosaa ja 17,1 – 22,6 % alkaaliliukoista.²⁷ Tästä voidaan päätellä, että heinän sisältämästä hemiselluloosasta osa liukenee veteen uutettaessa sitä. Tähän uutefraktioon kuuluu myös soluseinäsakkaridi pektiini.²⁸ Tämä todistaa sen, että osa hemiselluloosasta hajoaa hevosen ruuansulatuskanavan ohutsuolessa NSC:n tavoin. Suurimman osan rakenteellisten hiilihydraattien vapautuvasta energiasta hevonen saa käyttöönsä paksusuolen mikrobien ansiosta. Selluloosan sulamaton lignoselluloosafraktio kuitenkin tulee ruuansulatuskanavasta ulos.

3.2 Hevonen tarvitsee proteiineja laaja-alaisesti

Hevonen tarvitsee solujensa pääasiallisena lihaksiston rakennusaineena sekä solujen toiminnan ylläpitäjänä proteiineja. Proteiineja hevonen saa korsirehuista, väkirehuista ja tarvittaessa lisärehuista. Ei kuitenkaan ole mielekästä syöttää proteiineja yltäkyläisesti, vaikka hevosen ruuansulatusjärjestelmä sulattaakin sitä tarvittaessa rajattomasti. Ylimääräinen typpi poistuu hevosen elimistöstä virtsan mukana. Proteiinien sisältämällä typpellä on myös erittäin suuri ympäristöllinen vaikutus, kun typpipitoista hevosen lantaa ja käytettyjä kuivikkeita levitetään

pellolle.²⁹ Siksi on tärkeää tiedostaa rehujen proteiinipitoisuudet ja suunnitella jokaiselle hevoselle yksilöllisiä tarpeita tyydyttävä ruokavalio.

Proteiinin sulavuus vaihtelee syötettävän ravinnon sisältämän proteiinipitoisuuden mukaan.¹ Toisaalta rehun sisältämän proteiinin sulavuuteen vaikuttaa myös rehuannosten ravintoainekoostumus. Warren¹ lainaa artikkelissaan Gibbs *et al.*³⁰ tekstistä, että kasvisöljyä ja viljaa sisältävä korsirehuannos on sulavampaa kuin pelkkä korsirehu.¹ Warren jatkaa vielä omin sanoin, että öljyn ja viljan kanssa korsirehun proteiinit sulavat ja imeytyvät aminohappoina ensisijaisesti ohutsuolessa. Ohutsuolessa sekä haiman että pohjukais-suolen seinämäsolujen tuottamat entsyymit hajottavat yhtaikaisesti proteiinit aminohapoiksi, öljypisarat rasvahapoiksi ja hiilihydraattipolymeerit monomeereiksi, jotka välittömästi imeytyvät hevosen elimistön käyttöön. Ohutsuolen sekä fyysinen että entsyymaattinen toiminta stimuloi ja säätelee itsessään ruuansulatusta.

Perusravinnon, kuten korsi- ja väkirehujen tyyppiä sisältävien rakenteiden tarpeellisen määrän takaamiseksi voidaan lannoittaa lähtökohtaisesti tyyppipitoisuudeltaan alhaisia peltoja. Maaperä voidaan lannoittaa joko eläinten lannalla tai teollisesti tuotetuilla lannoitteilla. Molemmissa lannoitustavoissa lisätään myös monia muita sekä epäorgaanisia että orgaanisia alkuaineita pellolle tietoisesti ja tiedostamatta. Siksi on ehdottoman tärkeää ottaa viljeltävistä pelloista maaperäanalyysit määrääjain sekä rehuanalyysit viljeltävistä rehuista vuosittain. Tällöin voidaan tarvittaessa ryhtyä tarvittaviin toimenpiteisiin, jotta maaperä saadaan optimaaliseksi tietyille kasveille.

3.3 Rasvahapot taipuvat moneksi hevosen elimistössä

Sterolit ja rasvahapot ovat myös tarpeellisia hevosen hyvinvoinnille. Öljy on erinomainen ja erittäin helposti sulava energianlähde hevosille.²⁰ Hevonen tarvitsee kuitenkin pääasiassa erilaisia rasva-aineita etenkin solukalvojen rakenteiksi, sillä niitä uudistetaan jatkuvasti. Tällöin rasvahapot ovat osana fosfolipidejä, svingolipidejä tai glykolipidejä. Lisäksi rasva-aineita tarvitaan hormonien ja muiden rasvaliukoisten viestiaineiden valmistamiseen. Vapaat rasvahapot ovat vain osa kokonaisrasvamäärästä. Perusravinto korsirehu ja väkirehu sisältävät välttämättömiä rasvahappoja, mutta tarvittaessa hevosen lisäenergianlähteeksi voidaan antaa kasviöljyä. Hevosten aineenvaihdunnalliset ongelmat ja sairaudet ovat lisääntyneet, etenkin hiilihydraattiaineenvaihduntaongelmat. Hevosen hiilihydraattiaineenvaihduntaongelmien seurauksena hiilihydraattien määrää tulee ehdottomasti rajoittaa, etenkin nopeasti vapautuvien

sokreiden. Yhtenä korvaavana energianlähteenä hevostenkin käyttöön on otettu kasviöljyvalmisteet. Hiilihydraatit ovat kuitenkin välttämättömiä, jotta energia-aineenvaihdunta toimisi täysipainoisesti aerobisesti ja tuottaisi tarvittavan määrän energiaa. Rasvahappojen pilkkomisella β -oksideaatiolla kuitenkin voidaan korvata osa sitruunahappokierrossa tarvittavasta glykolyysin lopputuotteesta asetyyli-Co-A-molekyyleistä.^{14c)} Vapaat rasvahapot voivat metaboloitua vain aerobisesti, mikä on suhteellisen hidasta toimintaa, mutta tehokasta. Tällöin vain pieni osa kokonaisenergiasta häviää lämpönä.³¹ Hevosen elimistö tarvitsee kaikkia kolmea eri rasvahappotyyppiä, jotka mainittiin kappaleessa 2.4. Välttämättöminä rasvahappoina sen tarvitsee saada ravinnosta α -linoleeni- (C18:3) ja linolihappoa (C18:2). Niitä hevonen ei kykene itse tuottamaan. Muut alemman tyydyttyneisyysasteen rasvahapot se kykenee tuottamaan korkeamman asteen rasvahapoista.

3.4 Makro- ja mikromineraalit ovat välttämättömiä myös hevoselle

Hevoselle syötettävän perusravinnon, etenkin heinän, pitäisi sisältää kaikki hevosen tarvitsemat kivennäis- ja hivenaineet. Läheskään aina ei ole niin, sillä heinän sisältämien kivennäis- ja hivenaineiden määrät riippuvat monista tekijöistä. Mineraalikoostumukseen voi vaikuttaa heinälajikoostumus, monesko korjuukerta on kyseessä satokautena, korjuuajankohta, korsien kypsyyssaste, maaperän lannoitus ja rikkaruohojen määrä, eri rehuerät voivat sisältää hyvinkin erilaisia pitoisuuksia eri mineraaleja.³² Hevostaloudessa heinän muut ravitsemukselliset arvot ovat saaneet suuremman painotuksen kuin korsirehun kivennäis- ja hivenainekoostumus. Homogeenisesti viljellyn pellon sadon sisältämät mineraali- ja hivenainepitoisuudet ovat yleensä tyypilliset sille pellolle ja sadonkorjuuajankohdalle. Homogeenistä korsirehukasvustoa parempia mineraalilähteitä ovat erilaiset yleiset yrttikasvit. Siksi olisikin erittäin tärkeää, että etenkin hevoslaitumien laidunruoho olisi mahdollisimman monipuolista kasvilajistoltaan, jotta mineraalien tarve täyttyisi mahdollisimman luonnollisella tavalla. Tanskassa tehty tutkimus osoittaa, että yleisesti yrttien mineraaleista fosforin, magnesiumin, kaliumin, rikin ja sinkin pitoisuudet ovat suurempia kuin korsirehujen ja palkokasvien.³³ Valitettavasti kasveihin kertyy myös epätoivottuja epäorgaanisia siirtymäalkuaineita kuten lyijyä (Pb). Epäorgaanisten kivennäis- ja hivenaineiden absorptio kasviin tapahtuu maanesteen välityksellä. Happaman maan maa-ainepartikkelit ovat varaukseltaan negatiivisia. Ne luovuttavat positiivisia kationimineraaleja, kuten kalium (K^+), kalsium (Ca^{2+}) ja magnesium (Mg^{2+}), saadessaan kasvihengityksen sivutuotteena syntyviä positiivisia protoneita (H^+) maanesteen välityksellä. Kationien ja protonien vaihtomäärä pitää varaukset samana.^{9b)} Jos maaperä on köyhä joidenkin kivennäis- tai hivenaineiden suhteen, se

näkyä maaperän kasvuston mineraali- ja hivenainepitoisuuksissa. Toisaalta kunkin maalajin mineraalit ja hivenaineet ovat yleensä tyypillisiä juuri tietyille maalajille. Maalajin orgaanisen aineksen määrä myös vaikuttaa epäorgaanisten komponenttien määrään.

Kivennäis- ja hivenaineet ovat hevoselle välttämättömiä. Välttämättömien mineraalien puute tai vajavainen saanti voivat aiheuttaa hevoselle vakavia terveysongelmia.³³ Kivennäisaineita eli makromineraaleja ovat kalsium (Ca), fosfori (P), kalium (K), magnesium (Mg) ja natrium (Na). Vastaavasti hivenaineita eli mikromineraaleja ovat koboltti (Co), kupari (Cu), rauta (Fe), mangaani (Mn), sinkki (Zn), jodi (I) ja seleeni (Se). Lisäksi hevonen saa ravinnostaan myös, sille ei välttämättömiä kivennäisaineita, jotka ovat epämetallit rikki (S) ja kloori (Cl). Hevosen perusravinnon sisältämää vajaata mineraalikoostumusta voidaan täydentää antamalla hevoselle kivennäis- ja hivenainelisärehua. Hevosten mineraalitarve on päivittäistä.²⁵ Hevosten mineraali- ja hivenaineiden imeytyvyydestä on erittäin ristiriitaista tutkimusaineistoa. Osa tutkimuksista tukee epäorgaanisia valmisteita ja osa kelatoituneita organometalleja.

3.5 Ruuansulatuskanava tarvitsee kuitua toimiakseen tasapainoisesti

Kuitu on yksi tärkeimmistä hevosen tarvitsemista ravitsemuksellisista komponenteista. Kuitu muodostuu hemiselluloosasta, selluloosasta ja ligniinistä. Mitä pidemmälle korsi on korsiintunut sitä vähemmän se sisältää primaariseinän hemiselluloosaa ja sitä enemmän selluloosaa ja ligniiniä. Vähän kuitua sisältävä ravinto ei etene normaalisti ruuansulatuskanavan (GI-kanava) läpi, vaan aiheuttaa ruuansulatuksellisia ongelmia. Hevonen tarvitse pitkiä runkokuituja minimoidakseen ruuansulatushäiriöitä. Korsiintuneen heinän syöminen rajoittaa energian saantia ja voi aiheuttaa urheiluhevosille energianpuutosta.³⁴ Saman kausaali-suhteen toteaa Kärkönen *et al.*¹⁰ artikkelissaan ja avaa lignoselluloosan rakennetta kertoen, että ligniini liimaa seinäpolysakkaridit yhteen: soluseinistä tulee vahvoja ja vettä läpäisemättömiä. Ligniini on se yhdiste, joka estää kasvinsyöjäeläinten ruuansulatusentsyymien pääsyä seinäpolysakkaridien luo ja täten vähentää kasviaineksen hajoamista eläimen ruuansulatuksessa.¹⁰ Toinen näkökulma pitkälle korsiintuneen rehun käytöstä on, että helposti lihoville hevosille runsaan kuidun saanti voi olla pelastus lihomiselta.³⁵ Ligniinin kehittymistä säädellään kasvin perintökijöillä, mutta myös bioottisella ja abioottisella stressillä näyttää olevan vaikutusta siihen.³⁶ Kärkönen *et al.*¹⁰ kertovat artikkelissaan, että MTT ja Helsingin ja Oulun yliopistot yhteistyötutkimuksessa pyrkivät selvittämään sekundaarisoluseinän säätelymekanismia Timotei-heinässä. Sen avulla mahdollisesti voitaisiin

rajoittaa kuidun määrää ja parantaa heinän sulavuutta hevosen ruuansulatuskanavassa. Toisaalta se voisi mahdollistaa korjuuajan jouston, jos sääolosuhteet sitä vaatisivat. Edelleen hevonenkin saisi sille optimaalisesti suunnattua korsirehua. Hevosen ruuansulatuskanavan paksusuolen mikrobit hajottavat kuidun rakennehiilihydraatteja, joita hevosen elimistö absorboi ja käyttää vapautunutta energiaa hyväkseen.²⁰ Näin hevonen kykenee käyttämään korsirehun sisältämää hiilihydraattimäärää paremmin hyväkseen.

Kun tutkitaan rehunäytteiden sisältämän kuidun määrää, tyypillisesti ilmoitetaan erityyppisiä kuitukomponentteja sisältäviä pitoisuuksia. Kuidun eri komponenttien pitoisuussuhteet kertovat kasvin kasvuvaiheesta sekä niiden määrän arviolla kyetään määrittämään rehun sulavuutta. NDF sisältää liukenemattoman ligniiniä, liukoisen ligniiniä sekä hemiselluloosan ja selluloosan, jotka lasketaan yhteen. Kuituainesta voidaan hajottaa hapolla, jolloin kyetään määrittämään eroteltujen komponenttien avulla ADF:n osuus koko kuitumäärästä. ADF sisältää selluloosan ja ADL summana. ADL-pitoisuus on artikkeleissa yleisesti esitetty parametri.

4 TARJOLLA ON ERITYYPPISIÄ RAVINTOLÄHTEITÄ

Hevosen ruokinta koostuu korsirehusta, väkirehuista ja lisärehuista. Ne muodostavat ruokintapyramidin, jossa alimman kerroksen muodostaa korsirehu. Se voi muodostaa hevosen ruokavalioista 60 – 100 %.²⁵ Keskimmäisenä kerroksena on lisäenergiaa antavat väkirehut ja pyramidin huipulla on määrällisesti vähiten annettavat lisärehut. Hevosen tasapainoinen ruokavalio koostuu kaikista kerroksista suhteessa kerroksien pinta-alaan. Hevosille suunnattujen ravintolähteiden laajasta valikoimasta jokaiselle hevoselle löytyy tarvittavat rehut, jopa herkimmille ja ongelmallisimmille yksilöille. Tänä päivänä hevosten omistajien ongelmaksi on kehittynyt, että he syöttävät hevosilleen liikaa liian ravinteikkaita rehuja. Seurauksena hevoset voivat tulla ylipainoisiksi ja voivat jopa sairastua samoihin elintäsaairauksiin kuin me ihmiset. Tällöin hevosten liikunta suhteessa niiden ravinnosta saamaan energiamäärään on epätasapainossa. Ilmiö on jo havaittavissa ylipainoisten hevosten lisääntymisenä ja hevosten lisääntyneinä metabolisina sairauksina eri hevostalouslyksiköissä.

4.1 Korsirehut ovat hevosen ensisijaisia ravintolähteitä

Korsirehut ovat hevosen perusravinto, johon niiden ruokinta perustuu ensisijaisesti. Suomessa hevosten korsirehuna käytetään pääasiassa kuivaheinää ja esikuivattua säilöheinää. Korsirehuja ovat lisäksi tuore säilörehu, perinteinen laidunruoho sekä hevoscarsinan alusenakin käytettävä olki. Rehuanalyysin kannalta korsirehut voidaan jaotella kahteen päätyyppiin sen mukaan, onko niissä tapahtunut maitohappokäyminen vai ei.⁴ Tämän päivän korsirehuvalikoima on monipuolinen, valikoimasta hevosen omistajat ja tallinpitäjät voivat valita yksikössä asuvien hevosten tarpeiden mukaan sopivan tai sopivat rehun tai rehut. Ei ole mitenkään poikkeavaa että hevosityksikössä käytetään useampaakin heinälaatua samanaikaisesti. Saastamoinen³⁷ artikkelissaan suosittelee hevosenomistajan ja tallinpitäjän hankkivan tarvitsemansa karkearehun vain hevosheinän tuotantoon erikoistuneelta tuottajalta. Näin välttyään heinän laadullisilta ongelmilta.

Korsirehun laadun takaamiseksi, laadukkaiden ravintoarvojen lisäksi, on hyvä tarkastella sitä visuaalisesti. Visuaalinen analyysi tehdään silmämääräisesti muutaman tekijän tarkastelulla.¹⁷ Nadeau¹⁷ opastaa artikkelissaan tarkastelemaan heinän kypsyyttä. Se antaa viitteitä rehun sisältämästä kuidun määrästä. Rehun haju ja kunto sekä pölyämättömyys kertovat rehun hygieenisestä laadusta. Hyvän tuoksuinen (raikas ja hieman makea), puhdas ja pölyämätön rehu kertovat hyvin säilyvästä rehusta, on säilytystapa sitten mikä tahansa. Laadullista hygieniää korreloivat säilöntä tappiot. Rehun sisältämien erilaisten ravitsemuksellisten yhdisteryhmien koostumus, korjuuaika, säilöntätapa ja varastointi vaikuttavat rehun ravitsemukselliseen laatuun. Ravitsemuksellisten yhdisteryhmien koostumus vaihtelee kasvilajeittain. Pohjoismaissa hevosille yleisesti pääasiassa kasvatettava heinälajike on Timotei. Yleisesti Timotein lisänä käytetään erilaisina sekoitussuhteina erilaisia natoja (*Festuca*). Timotei on sokeripitoinen ja maittava lajike, kun nadat taas sisältävät hieman enemmän proteiinia. Lisäksi koostumukseen vaikuttavat rehuksvin kasvuaste ja sääolosuhteet niittäessä sekä lannoitus ja maaperä. Karkeasti voidaan esittää, että sokerien määrä kasvaa ja proteiinien määrä vastaavasti laskee kasvuston ikääntyessä. Lisäksi sadon kastuessa useaan otteeseen kaadon jälkeen proteiinin määrä rehussa vähenee. Säilöntämenetelmien kehittymisen myötä Pohjoismaissa asuvien hevosten korsirehun laatu on parantunut selkeästi. Kesän pitkät sadejaksot voivat ikävä kyllä edelleen hankaloittaa heinänkorjuuta. Koska säilöheinän ei tarvitse maata pellolla pitkiä aikoja kuivauksen takia, on kuitenkin mahdollista saada kohtuullisen laadukasta rehua sateisimpinakin kesinä.

4.1.1 Kuivaheinä on perinteinen hevosten perusrehu

Kuivaheinä on kasvullisesti heinäasteelle kasvatettua nurmirehua.³⁸ Tällöin heinäkasvit ehtivät kukkia loppuun. Kuivaheinä säilötään kuivamalla perinteisesti pellolla auringon ja tuulen avulla tai vaihtoehtoisesti osan ajasta perinteisesti pellolla ja koneellisesti latokuivurilla ladossa. Heinän ollessa pellolla kaadettuna, sitä pöyhitään säännöllisesti, jotta kuivuminen tapahtuisi mahdollisimman tasaisesti. Tarpeeksi kuivana se säilötään joko suuriin pyöröpaaleihin tai yleisesti noin 10 kg pikkupaaleihin. Kuivaheinän kuiva-ainepitoisuus > 85 % on suurin kaikista säilöntämenetelmistä.²⁵ Kuivaheinä sisältää vähemmän vettä kuin muut korsirehutyypit, siksi rehuannoksen paino on pienempi kuin vastaavan ravintomäärän sisältämät muut korsirehuannokset.

4.1.2 Esikuivattu säilöheinä on suosittu perusrehu

Säilöheinä korjataan heinäasteelle kehittyneenä kuten kuivaheinä. Säilötty tuorerehu vastaavasti korjataan jo aiemmin kuin säilöheinä. Kaadetun rehun annetaan kuivua perinteisesti pellolla 2 – 3 vuorokautta, jonka jälkeen se paalataan kookkaisiin kantti- tai pyöröpaaleihin ja kääritään ilmatiiviiksi paketiiksi muovin määrää säästelemättä. Kerättäessä heinää paaliin suihkutetaan maitohappobakteeri- tai säilöntäaineliuosta mahdollisimman tasaisesti heinän joukkoon säilyvyyden takaamiseksi. Esikuivatussa säilöheinässä säilöntään käytetään maitohappobakteerivalmisteita ja tuoreen rehun säilömiseen säilöntähappoa. Kasveissa esiintyy luonnollisesti epifyyttisiä maitohappobakteereita, jotka fermentoivat solunsisällyshiilihydraatteja pääasiassa maitohapoksi ja muiksi orgaanisiksi hapoiksi anaerobisen käymisen kautta.³⁹ Esikuivatun säilöheinän säilyminen perustuu rehun happamuuteen ja hapettomiin eli anaerobisiin olosuhteisiin. Mikä on hyvin luonnollinen menetelmä kasvien säilöntään. Anaerobinen tila lopettaa kasvihengityksen. Se myös estää aerobisten mikrobien kasvun sekä edistää maitohappobakteerien kasvua. Lisäksi alhainen pH estää rehua pilaavien haitallisten mikrobien toiminnan. Säilöheinästä voidaan tehdä lähes kuivaheinän kaltaista kuivattamalla sitä pellolla hieman pidempään säiden salliessa. Rehun esikuivaus vähentää mikrobien kasvulle välttämättömän vapaan veden määrää eli lisää osmoottista painetta.³⁸ Kun vapaan veden määrä vähenee, heinän käyminenkin rajoittuu. Säilöheinän kuiva-ainepitoisuus voi vaihdella välillä 45 – 85 %.²⁵ Mitä pienempi kuiva-ainepitoisuus on, sitä kosteampaa on rehu.

4.1.3 Laidunruoho maittaa hevoselle parhaiten

Luonnostaan hevonen syö ravintolähteenään tuoretta laidunruohoa. Hevonen syö mielellään erityyppisiä kasveja aina silloin, kun se on mahdollista. Pääsääntöisesti hevonen ei syö myrkyllisiä kasveja, kuten niittyleinikkiä ja erilaisia villakkoja. Sisäruokinnassa käytettävien säilöntäprosessien myötä myrkyllisten kasvien ominaistuoksut, värit ja suutuntuma ovat muuttuneet, jolloin hevonen ei kykene tunnistamaan niitä, vaan syö ne. Hevonen syö mieluiten noin 15 cm mittaista ruohoa.⁴⁰ Tuoreessa ruohossa on paljon sokereita ja vähän kuitua.²⁵ Lisäksi se sisältää paljon proteiinia, rasvaa, karoteenia, C-vitamiinia sekä Tiamiinia (B1-vitamiini) ja Riboflaviinia (B7-vitamiini), ja niiden pitoisuudet korreloivat heinäkasvien kasvun fysiologisen asteen kanssa.⁴¹ Ruohon kasvaessa sen korsiintuminen etenee, jolloin sen kuitupitoisuus kasvaa. Jos hevoset päästetään laitumelle, jonka nurmi on jo pitkälle korsiintunutta, hevoset varomattomuuttaan tallaavat heinänsä lakoon, jolloin se jää syömättä. Laidunruohon kuiva-ainepitoisuus on vain 14 – 20 %.²⁵

4.2 Väkirehut antavat tarvittaessa hevoselle lisäenergiaa

Väkirehujä annetaan hevoselle lisääntyneen energiatarpeen tyydyttämiseksi, kun korsirehun energian määrä ei riitä. Lisäenergiaa hevonen saa tärkkelyksestä. Hevosille annetaan väkirehua yleensä kaksi kertaa päivässä.⁴² Suomessa kuitenkin on tapana antaa useammin, mutta pienemmissä annoksissa kuin Hillin⁴² julkaisemassa katsauksessa. Tänä päivänä lisäenergiälähteitä on erittäin monipuolinen valikoima, on perinteiset viljat ja teollisesti prosessoidut väkirehuvalmisteet. Suurin osa suomalaisista hevosista syö edelleen kotimaista viljaa etenkin kauraa, mutta yhä useammalle suomalaiselle hevoselle syötetään teollisesti tuotettuja väkirehujä. Teollisesti tuotettuja rehujen ruokinnan vaikutuksia on jo tutkittu jonkin verran.¹ Teollisesti tuotetut väkirehut ovat kohtuullisen uusi ruokintamenetelmä suomalaisessa hevostaloudessa, etenkin 2000-luvulla tuotevalikoima on kasvanut erittäin paljon.

4.2.1 Viljat ovat perinteisiä hevosten väkirehujä

Hevosten lisäenergianlähteenä voidaan käyttää kauraa, ohraa ja maissia. Viljojen ravintoarvoa voidaan kasvattaa esikäsittelemällä kokonaisia jyviä mekaanisesti, lämpökäsittelyllä tai lämpökäsittelyllä ja mekaanisesti sekä kastelemalla tai kuivaamalla. Tutkijat ovat vertailleet eri käsittelymenetelmiä ja tulleet johtopäätökseen, että kaikilla menetelmillä kyetään parantamaan

viljojen sulavuutta koko ruuansulatuskanavassa.⁴³ Kaura sisältää vähemmän energiaa ja tärkkelystä kuin muut viljat. Se on hevoselle erittäin käyttökelpoista väkirehua. Sitä ei tarvitse välttämättä litistää tai kypsentää ennen käyttöä.²⁵ Kastelemalla sitä juuri ennen ruokintaa, voidaan pehmentää siemenen kuorta ja saada siten tärkkelys ja muut ravintoaineet paremmin hevosen hyödynnettäväksi. Hevosen ruuansulatuskanavan alussa, hevosen suussa, syljen sisältämä amylaasientsyymi aloittaa viljan tärkkelyksen hajottamisen. Entsyymi pääsee kosketuksiin tärkkelyksen kanssa heti, kun hevonen on suussaan jauhanut viljanjyvät rikki. Tärkkelyksestä vapautuvaa glukoosia imeytyy primäärisesti ohutsuoletta, mutta myös paksusuolen kautta. Suuret vilja-ateriat voivat aiheuttaa mahalaukun sekä ohutsuolen ruuansulatuskapasiteetin ylittymistä, jolloin rehun sisältämät hiilihydraatit fermentoituvat hyvin nopeasti paksusuolella.³¹ Kertaruokinnan tärkkelyspitoisuus ei saisi ylittää 200 g tärkkelystä per 100 kg kehonpaino. Tällöin tärkkelyksestä hyödynnettävän energian määrä on vähäisempi kuin silloin, kun hevoselle annettavan väkirehun määrä on alle 200 g tärkkelystä per 100 kg kehonpaino. Hevosen saadessa tärkkelyspitoista ruokaa alle 50 g tärkkelystä per 100 kg kehonpainoa kohti sulamatonta tärkkelystä ei esiintynyt lainkaan. Vastaavasti paksusuolella fermentoitumista esiintyi 70 – 150 g tärkkelystä per 100 kg kehonpaino. Jos hevonen hotkii ruokansa, eikä pureskele sitä kunnolla, voi kokonaisista väkirehujyvistä osa tulla koko ruuansulatuskanavan läpi ja erottua silmämääräisesti lannasta. Lannan sisältämät jyvät voi kuvastaa myös ruuansulatuskanavan heikkoa sulatuskykyä ja mahdollisia toimintahäiriöitä.⁴³ Ruuansulatuskanavan heikentynyttä ja häiriintynyttä toimintaa esiintyy etenkin vanhemmilla hevosilla.

Kauran sisältämän tärkkelyksen rakennetta on tutkittu sekä ravitsemuksellisen funktiona että teknologisen potentiaalisuutensa takia.⁴⁴ Kauran tärkkelyksen kemiallista koostumusta ei ole kuitenkaan tutkittu, niin paljon kuin muiden viljojen, koska sen tärkkelystä ei ole helppoa eristää muista komponenteista.²² Kauran tärkkelys sisältää amyloosin ja amylopektiinin lisäksi reilusti lipidejä ja proteiinia. Niiden pitoisuudet ovat huomattavastikin suurempia kuin muiden viljojen. Lineaarinen amyloosi ja haaroittunut amylopektiini ovat tärkkelyksen pääkomponentit. Ne muodostavat tärkkelysrakeita, josta proteiinit on paikallistettu erillisinä rakenteina.⁴⁵ Tärkkelysjyvästen runsas rasvahappomäärä ja sen koostumus lisäävät kauran ravitsemuksellista laatua. Kauran sisältämien lipidien koostumuksella on myös ominaisuutensa antava merkitys sekä merkitystä tärkkelyksen liitännäistuotteiden, kuten proteiinien liikuttelussa.⁴⁴ Kauran runsas rasvan määrä myös pilaannuttaa hyvin nopeasti litistetyn ja kastellun kauran etenkin kesäaikaan, kun ilman lämpötila on korkea.

4.2.2 Teollisesti tuotetut väkirehut ovat syrjäyttämässä perinteiset väkirehut

Teollisesti tuotetut väkirehut ovat väkirehujä, jotka ovat yleensä kohdennettu tiettyntyyppisille hevosille. Nämä väkirehut on kehitetty yleensä kohderyhmän erikoistarpeita tyydyttäväksi. Näitä kohderyhmiä ovat muun muassa tiineet ja imettävät tammät, kasvat varsat ja nuoret hevoset, ikääntyneet hevoset, kilpailevat hevoset sekä tärkkelystä ja/tai sokeryyliherkkyydestä kärsivät hevoset. Nämä teollisesti tuotetut väkirehut ovat pääasiassa tiiviste- tai täysrehuja. Nykyaikana on myös tarjolla molempia rehutyyppejä perusrehuiksi kaurattomana sekä kauraa sisältävinä. Kaurattomissa vaihtoehdoissa kaura on korvattu ohralla (tärkkelystä 60 %) ²⁵ ja vehnällä tai vehnänleseellä. Jotkut hevoset voivat olla herkkiä joidenkin väkirehujen sisältämien yhdisteiden pilkkoutumisnopeuden aiheuttamalle energian ylimäärälle. Tällöin hevoselle voi tulla käyttäytymishäiriöitä. Tämä ”kuumiaminen” on yhteydessä nopeasti imeytyvien tärkkelyksen ja glukoosin määrän suhteeseen. ⁴⁶ Nämä yhdisteet saavat aikaan nopean verensokerin nousun. Välttämättä näille hevosille ei tule lääketieteellisesti havaittavia oireita. Vähäisimmillään epäsojiva väkirehu voi aiheuttaa käytöksellisiä häiriöitä ja pahimmillaan terveydellisiä ongelmia. Teollisesti tuotetut väkirehut sisältävät tyypillisesti kaikki hevosen tarvitsemat ravinteet sekä vitamiinit. Jos syöttää teollisesti tuotettua väkirehua, on huomioitava se lisärehujen annossa. Teollisesti tuotettujen rehujen ohella ei yleensä tarvitse antaa lisärehujä lainkaan.

4.3 Ruokavaliota voidaan tarvittaessa täydentää lisärehuilla

Heinän ja viljan lisäksi ravitsemuksellisia lisärehujä annetaan hevosille hyvin yleisesti hevostaloudessa. ¹ Lisärehujen tarkoituksena on tukea hevosen ravitsemuksellista tarvetta täydentämällä ruokintaa lähinnä vitamiinein, kivennäisainein ja hivenainein. Lisärehujen tarkoituksena on edistää hevosen terveyttä, kuten esimerkiksi suoliston toimintaa, karvapeitteen ja kavioiden kuntoa sekä vastustuskykyä. ²⁵ Hevosten omistajilla on taipumusta ruokkia hevosiaan liikaa, etenkin lisärehuilla. Lisärehujen liika syöttäminen ei pelkästään rasita hevosen elimistöä, vaan on myös haitaksi ympäristölle. Lisäravinteiden käyttö ei saisi perustua pelkkään muotivirtaukseen vaan hevosen oikeisiin tarpeisiin. Lisäravinteiden käyttö on selkeästi tämän päivän ongelma hevosten ruokinnassa. Lisäksi lisäravinteiden kemiallisella muodolla on erittäin suuri merkitys niiden imeytymiselle sekä hyödyntämiselle hevosen elimistössä.

Hevoset ryhmitellään mineraali- ja hivenainetutkimuksissa pääasiassa niiden erilaisten mineraalitarpeiden mukaan. Ryhmiä ovat aikuiset ja vähän liikkuvat perustarvehevoset, aikuiset

kovassa työssä olevat hevoset, imettävät tamma ja 1 – 3 kuukautta vanhat imevät varsat ja liikkuvat 13 – 24 kuukauden ikäiset nuoret hevoset.³² Hevosen liikunnan määrällä sekä nuoren hevosen kasvulla on suuri vaikutus erilaisten mineraalien tarpeeseen. Ylivoimaisesti eniten mineraaleja kuitenkin tarvitsee imettävä tamma ja imevä varsa. Tarve on pääsääntöisesti kaksinkertainen aikuisen hevosen perustarpeeseen nähden.

5 HEVOSEN LANTA PALJASTAA RAVINTOAINEPITOISUUKSIEN MUUTOKSET

Jokaisella eliöllä ruuansulatus tarvitsee lajille tyypillisen ajan, jotta se kykenee hajottamaan ja erottelemaan ruokamassan sisältämät erilaiset ravintoaineet ja ravinteet. Kun hevonen syö rehuannoksensa, voidaan odottaa saman annoksen erittyvän ulos peräsuolesta noin kolmen vuorokauden kuluttua.⁴⁷ Ruuansulatuskanavan erilaiset fysikaaliset toiminnot, kuten sekoittavat ja ruokamassaa suolessa eteenpäin työntävät toiminnot, sekä ruokamassaa hajottavat ruuansulatusentsyymit mahdollistavat ravintoaineiden siirtämisen hevosen elimistön solujen käyttöön. Hevonen ei kykene käyttämään ravintonsa sisältämiä ravintoaineita ja ravinteita täysin hyödykseen, mikä nähdään lannan kvantitatiivisessa kemiallisessa koostumuksessa, vaikka ruuansulatuskanavassa ravintoaineiden imeytymistä tapahtuu sekä ohut- että paksusuolella. Pääasiassa ravintoaineet imeytyvät ohutsuolen kautta, mutta joidenkin ravintoaineiden imeytymistä tapahtuu vielä paksusuolesta. Ohutsuolesta imeytyvät ruuansulatusentsyymien pilkkomat hiilihydraattimonomeerit, aminohapot ja rasvahapot sekä muut hevosen tarvitsemat ravintoaineet, kuten esimerkiksi vitamiinit. Ravinteista osa imeytyy ohutsuolen ja osa paksusuolen kautta. Paksusuolen mikrobit hajottavat edelleen ohutsuolesta paksusuoleen siirtynyttä ruokamassaa ja ottavat käyttöönsä massan sisältämiä ravintoaineita, lähinnä energiaa. Hevosen ruuansulatuskanavan paksusuoliosassa tapahtuu ravinteiden imeytymistä ruokamassan mikrobihajotuksen jälkeen. Hevosen ruuansulatuskanavan paksusuolen mikrobit hajottavat kuidun rakennehiilihydraatteja, joita hevosen elimistö absorboi ja käyttää vapautunutta energiaa hyväkseen.²⁰ Paksusuolesta imeytyy sekundaarisesti vesiliukoisia hiilihydraatteja ja aminohappoja sekä lisäksi primaarisesti soluseinän hemiselluloosaa ja selluloosaa.⁴⁷ Huomattavaa on, että paksusuolen kautta ei enää imeydy rasva-aineita.

5.1 Hevosen ruokavalion laadulla on vaikutusta ruuansulatusaikaan

Hevoselle syötettävän korsirehun korsiiintumisasteella on suuri merkitys rehun sulavuudelle hevosen ruuansulatuksessa. Hevosen ruuansulatus vaatii korsirehulta jonkin asteista korsiiintumista, se takaa paremman ruuansulatuskanavan toiminnan.⁴⁸ Tuore juuri kasvunsa aloittanut ruoho tai vain hyvin vähän kuitua sisältävä heinäkasvusto eivät ole yhtä optimaalista ravintoa, vaikka onkin hevosen luontaista ravintoa. Kun hevonen laidunkautena pääsee ensimmäisiä kertoja laidunruohoa syömään, se ahmii sitä kyltymättömästi. Tällöin hevosella on vaarana saada vatsavaivoja. Koska tuore ruoho sisältää vain vähän kuitua ja paljon vettä, ruokamassa kulkeutuu ruuansulatuskanavan läpi liian nopeasti. Ruohon sisältämä runsas vesimäärä ei ehdi imeytymään kokonaan vaan kulkeutuu osittain ruokamassan mukana. Toisaalta liian vähäinen kuidun määrä ei viivytä ruokamassaa ruuansulatuskanavassa tarpeeksi, vaan ruokamassa tulee kanavasta ulos liian nopeasti.⁴⁷ Hevosen lanta on tällöin normaalia löysempää, sille ominainen ”munkkimainen” rakenne ei ole yhtä tiivis tai sitä ei ole lainkaan, kuten silloin, kun ravinto on tarpeeksi kuitupitoista. Hevosen ruuansulatuskanavan toiminta tarvitsee kasvukuitua toimiakseen normaalisti. Ruokamassan keskimääräinen sulatusaika vaikuttaa suuresti kuidun hajoamisen määrään.⁴⁹ Toisaalta mitä enemmän rehussa on kuitua, sen enemmän rehu tarvitsee sulatusaikaa. Mikä taas vastaavasti korostuu, kun hevonen syö erittäin pitkälle korsiiintunutta rehua tai olkea, jolloin ruuansulatus hidastuu normaalista poiketen. Ruuansulatuskanavan toiminta voi hidastua äärimmilleen niin, että hevonen saa ummetusoireita. Tällöin ruuansulatuskanavassa ruokamassaa sulatetaan liian pitkään, jolloin se ei etene vaan aiheuttaa tukkeuman.

Kun arvioidaan korsirehun soveltuvuutta hevosten rehuksi, ovat kuiva-aineen määrittäminen ja orgaanisen aineen sulavuus erinomaisia indikaattoreita käytettäväksi.⁵⁰ Toisaalta, tarkastellessa hevosen ravitsemusta, voidaan tarkastella ravinteiden näennäistä sulavuutta ja ruuansulatusaikaa ruuansulatuskanavassa. Dieetin eri komponenttien kokonaissulavuus ruuansulatuskanavassa kertoo ruuansulatuskanavan käytöstä ja selittää osittain ruuansulatuksen tarvitseman ajan, eli kauanko ruoka viipyy ruuansulatuskanavassa.⁵¹

Miyaji *et al.*⁴⁹ ovat tutkineet heinän fyysisen muodon vaikutusta sekä heinän ruuansulatusaikaan että sen sulavuuteen hevosen ruuansulatuskanavassa. Fyysisellä muodolla tarkoitettiin joko pilkottua / haketettua tai jauhettua korsirehua. Yhtenä tutkimusnäytteenä heillä oli myös Suomessa viljeltävää Timotei-heinää. He käyttivät koehevosina Japanilaisia paikallisia Hokkeidon hevosia. Tutkimuksessa saatiin tulokseksi, että mitä pienempi partikkelikoko oli, sitä pidempi oli keskimääräinen ruuansulatusaika. Toisaalta syötettäessä haketettua korsirehua jauhettun rehuun

sijaan, kuidun sulavuus ei huonontunut, vaikka kokonais- ja segmentaalinen ruuansulatusaika lyhenivät.⁴⁹ Jauhettaessa korsirehua pieniksi partikkeleiksi järjestäytynyt kuiturakenne hajoaa ja ottaa enemmän tilaa kuin hevosen pureskelema rehu, ruokamassan saapuessa sulatukseen. Näyttää siltä, että korsirehun sulavuuden kannalta partikkelien koolla ei kuitenkaan ole vaikutusta, mikä on oleellisempaa hevosen kannalta.

5.2 Hevosen käyttämä ruokavalio näkyy lannan koostumuksessa

Lannan kemiallista koostumusta on tutkittu pääasiassa sen sisältämien lannoittavien ominaisuuksien näkökulmasta sekä etenkin viimeaikoina sen sisältämän energian hyödyntämisen biokaasun ja lämmön tuotannon näkökulmasta. Hevosen lannan ravinteet ovat ensisijaisesti peräisin ravinnosta.¹ Hevonen ei kykene käyttämään ravintonsa kaikkia ravinteita, 30 – 70 % syödyn rehun sisältämästä tyypestä ja fosforista poistuu elimistöstä lannan mukana.³⁰ Hevoslanta sisältää merkittäviä määriä tyypeä (N), fosforia (P) ja kaliumia (K) sekä pienempiä määriä muita ravinteita kuten kuparia (Cu), sinkkiä (Zn) ja seleeniä (Se). Nämä ravinteet voivat toimia lannoitteiden tavoin.¹ Kun asiaa katsotaan toisesta näkökulmasta, voi hevoslannan ravinteilla olla jopa saastuttava vaikutus etenkin pelloilla, koska siirtymäalkuaineista etenkin raskasmetallit voivat kerääntyä maaperään suurinakin pitoisuuksina ja vaikuttaa maaperän kemiaan sekä siinä kasvaviin kasveihin epäsuotuisasti. Siksi olisi erittäin hyvä asia, että hevosten omistajat perehtyisivät hevosiansa tarpeisiin eivätkä ruokkisi hevosiaan holtittomasti. Hevosen perusravinto, korsi- ja väkirehu, jo pelkästään voivat sisältää täysivaltaisesti hevosen tarvitsemat ravintoaineet ja ravinteet.

Hevostallissa käytettävällä kuivikkeella on merkitystä hevosen lannan koostumukselle. Yleisimmät kuivikkeet ovat kasvi- ja puupohjaisia, kuten turve ja puupuru sekä -pelletit ja joissain määrin olki. Sisäruokinnan aikana hevonen syö tahattomasti myös karsinansa kuiviketta, sillä syödessään se ei kykene erottelemaan kaikkia kuivikehiukkasia rehunsa seasta. Toisaalta jotkut hevoset syövät kuivikettaan myös ajanvietteenä, mikä voidaan huomata kuivikkeen vähenemisenä karsinassa.⁵² Kuivikkeen syöminen tiedetään vaikuttavan hevosen lannan kemialliseen koostumukseen. Se voidaan huomata lannan kemiallisessa analyysissä. Erilaisten lantatutkimusten yhteydessä mainitaan yleensä kuivikkeen laatu.

6 ESIKÄSITTELYMENETELMÄT REHUANALYTIIKASSA

Näytteen esikäsittely on yksi osa kemiallista analyysiä. Sen voi mahdollisesti jättää pois, jos analyysilaitte ei edellytä sitä. Tutkittaessa kiinteiden näytteiden sisältämiä erilaisia yhdisteitä tai yhdisteryhmiä, näytteitä tarvitsee usein esikäsitellä niin, että näytteen sisältämät yhdisteet ovat liuenneessa muodossa. Useimmat analyysilaitteet vaativat näytteiltä joko nesteeseen tai kaasuun liunneen olomuodon. On myös kehitetty tutkimusmenetelmiä kiinteiden näytteiden tutkimiseen, mikä on tehnyt näytteiden kemiallisen koostumuksen tutkinnasta huomattavastikin helpompaa ja nopeampaa. Kiinteiden näytteiden analysointitekniikoiden käyttö on hyvin yleistä etenkin rehuanalyysejä tekevissä laboratorioissa.⁵³ Kun kiinteästä näytteestä halutaan liuottaa tiettytyyppisiä yhdisteitä, voidaan joutua käyttämään hyvinkin voimakkaita reagensseja ja menetelmiä. Kun tehdään yksityiskohtaista rehuanalytiikkaa erityyppisille ravintoaineille, ne erotellaan alkuperäisestä tai jo käsitellystä näytteestä eri menetelmillä. Näytteen sisältämien ravintoaineiden olomuodolla ja sijainnilla rakenteessa, on suuri merkitys sille minkä tyyppistä esikäsittelyä käytetään. Tässä kappaleessa käsiteltävät rehuanalytiikassa edelleen käytössä olevat esikäsittelymenetelmät ovat myös soveltuvia muihinkin vastaavan tyyppisiin analyyseihin.

6.1 Orgaanisten yhdisteiden erottelu Soxhlet-uuttoa käyttäen

Soxhlet -uutto on uutomenetelmä, jolla voidaan nopeuttaa ja tehostaa esimerkiksi erilaisten orgaanisten yhdisteiden erottelua elintarvikkeista tai eläinrehuista. Menetelmää käytetään huomattavastikin keskenään erilaisten näytteiden esikäsitelyyn. Tämän menetelmän pääperiaatteena on liuottaa lämmön avulla höyrystettävällä liuottimella tiettytyyppisiä yhdisteitä kiinteästä, useimmiten pieneksi jauhetusta, näytteestä. Höyrystetty liuotin tiivistetään takaisin jäädyttämällä sitä pystyjäädyttimessä, jolloin liuotin valuu näytteen kanssa samaan tilaan. Näyte on pakattu selluloosasta valmistettuun ja liukenemattomaan uuttohylsyyn, joka vettyy läpi. Soxhlettiin kertyy liuotinta, minkä seurauksena näytteestä liukenee liuottimen liuottavia yhdisteitä. Kun soxhlet täyttyy tiettyyn mittaun, lappo tyhjenee. Tyhjenemisen jälkeen kierto alkaa alusta. Lapon kiertoa voidaan säädellä liuottimen höyrystymisnopeuden avulla säätämällä lämmitystä. Ei ole mielekäästä pitää kiertoa liian hitaana, toisaalta liian nopea kierto voi aiheuttaa vaaratilanteita. Liuotin mitataan kolviin, jossa on muutama kiehumakivi takaamassa tasaisen kiehumisen. Liuottimeksi valitaan yhdiste, joka liuottaa haluttua yhdistettä tai haluttuja yhdisteitä. Orgaanisia yhdisteitä uutettaessa valitaan yleensä poolinen tai pooliton liuotin, sen mukaan kumpaan ryhmään

eroteltava yhdiste tai eroteltavat yhdisteet kuuluvat. Uuton jälkeen liuotin haihdutetaan yleensä pyöröhaihduksella kuiviin, jolloin astiaan jää vain erottunut näytefraktio. Analyysimenetelmästä riippuu, miten erotettua näytefraktiota jatkokäsitellään.⁵⁴

6.1.1 Poolittomat rasvaliukoiset uuteaineet

Kun halutaan erotella ruoka-aineiden ja eläinrehujen sisältämät rasvaliukoiset uuteaineet, kuten rasvat ja rasvahapot, erotteluun käytetään uuttomenetelmää. Soxhlet -uutto on hyvin tunnettu ja yleinen menetelmä uuteaineiden erotteluun. Kun uutetaan rasvaliukoisia uuteaineita, on menetelmään liuottimeksi valittava pooliton liuotin. Rasvaliukoiset uuteaineet liukenevat poolittomina yhdisteinä poolittomiin liuottimiin. Dietyylieetteri ja heksaani (käytetympi) uuttavat merkittävän paljon ei-ravitsemuksellisia, ei-saippuuituvia lipidejä rehuista. Uuttamalla eristetyt lipidit, joilla on ravitsemuksellista merkitystä, esiintyvät usein kaksiarvoisina kationisuoloina. Heksaani on poolittomampi kuin dietyylieetteri, jonka takia se uuttaa vähemmän solukalvon lipidejä. Tällöin tulos on pienempi kuin dietyylieetterillä uutettaessa. Dietyylieetteri uuttaa myös hieman vesiliukoisia yhdisteitä kuten ureaa ja heksoseja.⁵⁵

6.1.2 Pooliset vesiliukoiset uuteaineet

Kun halutaan erotella ruoka-aineiden ja eläinrehujen sisältämiä liukoisia uuteaineita, erotteluun voidaan käyttää uuttomenetelmää. Liuottimena on mahdollista käyttää vettä tai jotain muuta poolista puhdasta yhdistettä tai niiden seosta, sen mukaan mitä halutaan erotella. Hiilihydraattien erotteluun voidaan käyttää vettä ja etanolia. Jos halutaan pelkästään erotella monomeerit, kuten glukoosi ja fruktoosi, poolisen liuottimen on hyvä olla hieman erilainen kuin erotellessa mukaan myös polymeeriset hiilihydraatit. Metanolin ja veden sekoituksella saadaan paremmin eroteltua glukoosi ja fruktoosi kuin etanolin ja veden sekoituksella.²¹ Soxhlet -uutto on edelleen hyvin käytetty erottelumenetelmä, kun halutaan tutkia WTC:n määrää orgaanisista näytteistä. Menetelmä on jo vanha. Sen on kehittänyt Somogyi⁵⁶ ja julkaissut artikkelissaan vuonna 1945. Noin 25 vuotta myöhemmin Salo⁵⁷ kehitti menetelmää rehuanalyysiin paremmin soveltuvaksi. Suomen maataloustieteellisen seuran julkaisussa julkaistussa sovellusversiossa ohjeistetaan, että heinäkasvien sisältämien hiilihydraattien uuttossa voidaan käyttää 60 – 95 % etanoli-vesi seosta, riippuen siitä, mitä hiilihydraatteja halutaan erottuvan.⁵⁷ Uuttamiseen yleisimmin käytetään etanoli-vesiseosta, joka sisältää 80 % etanolia sekä Soxhlet -uuttolaitteistoa. Tällöin näytteestä erottuu

mono-, di- ja oligosakkaridit. Jotta saadaan myös fruktaanit eroteltua, tulee työssä käyttää huoneenlämpöistä etanolia.⁵⁸ Parhaan tuloksen saamiseksi sokerien erottuminen kokonaisuudessaan tapahtuu 5½ tunnin kuluessa.⁵⁹ Liukoisten sokerien uuttaminen voidaan tehdä myös suoralla keittomenetelmällä. Tällöin kuitenkin veteen liukenee myös hemiselluloosan sisältämiä hiilihydraatteja, mikä vääristää liukoisten sokerien suhteellista pitoisuutta näytteessä.

6.2 Rikkihappohydrolyysi esikäsittelynä kokonaishiilihydraattien ja ligniinin määrityksessä

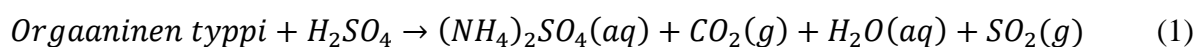
Määritettäessä kasvimateriaalin soluseinän sisältämien pääasiallisten yhdisteiden pitoisuuksia, käytetään näytteinä rasvaliukoisista uuteaineista vapaita näytteitä. Kun rasvaliukoiset uuteaineet on uutettu ja näytteet ilmakeivattu, ovat näytteet valmiit rikkihappohydrolyysivaiheeseen. Rikkihappohydrolyysin avulla hajotetaan kasvisoluseinää niin, että erottelun jälkeen kyetään määrittämään soluseinähiilihydraattien, happoon liunneen ligniinin (ADL) ja happoon liukenemattoman ligniinin suhteellinen määrä sekä laskemaan hemiselluloosan ja selluloosan osuudet soluseinässä.

Rikkihappohydrolyysissä^{3,19,34,49,51,60} käytetään jääkaappikylmää 72 % rikkihappoa (H₂SO₄). Happohydrolyysin avulla hajotetaan kasvisolun erityyppisiä hiilihydraattipolymeerejä, kuten hemiselluloosaa, selluloosaa, pektiiniä ja tärkkelystä. Lisäksi osa selluloosan ligniinistä hydrolysoituu. Jos heinä on hyvin pitkälle korsintunutta, liukenemattoman ligniinin suhteellinen määrä on suurempi kuin liunneen ligniinin. Näytteitä pidetään kontrolloidussa 30 °C vesihauteessa tunnin ajan välillä sekoittaen. Näytteet siirretään autoklaavissa käytettäviin säilöpulloihin, samalla laimentaen näytteet vedellä tiettyyn pitoisuuteen hapon suhteen. Autoklaavissa näytteitä pidetään ohjeen mukaisen ajan. Autoklaavissa reaktioseoksen reaktiota nopeutetaan paineen ja lämpötilan avulla suljetuissa reaktioastioissa ja laitteissa. Happohydrolyysiä jatketaan autoklaavin avulla, jonka jälkeen jäähdytetystä näytteestä erotellaan eri fraktiot toisistaan.

6.3 Kjeldahlin hajotus typpiyhdisteille

Orgaanisen materiaalin sisältämän typen määrittämisessä käytetään edelleen yleisesti Kjeldahlin määrittäystä, vaikka menetelmä onkin yli 130 vuotta vanha. Se on julkaistu ensimmäisen kerran vuonna 1883 ja noin 100 vuotta myöhemmin se vasta kuvattiin täydellisesti.⁶¹ Kjeldahlin menetelmän lisäksi typenmäärittäykseen on kehitelty Dumasin menetelmä. Se ei kuitenkaan ole

syRJäyttänyt Kjeldahlin menetelmää, vaikka Simonne *et al.*⁶² arvioivat menetelmän olevan käytännöllisempi kuin Kjeldahlin. Tarkasteltaessa artikkelissa esitettyjä eri näytteiden typpipitoisuuksien määrittystuloksia huomataan, että Dumasin menetelmällä saadut tulokset ovat hyvin samankaltaiset tai joidenkin näytteiden kohdalla jopa määrällisesti paremmat kuin Kjeldahlin menetelmällä saadut tulokset. Kjeldahlin menetelmä sisältää kolme eri vaihetta, jotka ovat esikäsitteilyvaiheena tehtävä poltto, jolloin näyte hajoaa, sekä määrittäsvaiheena valinnaisesti tehtävät tislauksen ja titrauksen tai kalorimetrinen määrittäminen. Kjeldahlin määrittäminen perustuu näytteen sisältämien orgaanisten typpiyhdisteiden (myös ammonium-) hapettamiseen vahvalla rikkihapolla (H₂SO₄) kuumissa oloissa (400 - 450 °C) ja kuparikatalyytin (Kjel-tabletti) läsnä ollessa.⁶² Näytteen sisältämä typpi hapettuu ja sitoutuu reaktioyhtälön 1 mukaisesti ammoniumsulfaatiksi ((NH₄)₂SO₄), lisäksi reaktiossa vapautuu kaasuna hiilidioksidia, vettä ja rikkidioksidia.



Menetelmän määrittäsvaiheesta kerrotaan kappaleessa 7.2 Typpipitoisuuden määrittäminen Kjeldahlin menetelmällä.

6.4 Mineraalien määrittäminen mikroaaltouuniavusteista hajotusta apuna käyttäen

Mikroaaltouuni on erittäin hyvä apuväline, kun halutaan hajottaa kemiallisesti jopa vaativampiakin yhdisteitä ja materiaaleja. Sitä käytetään yleisesti apuvälineenä etenkin haastavien tuhkanäytteiden hajotuksessa. Mikroaaltouunin toiminta perustuu sähkömagneettisten mikroaaltojen käyttöön. Näiden aaltojen taajuus on 2450 MHz. Mikroaallot synnytetään magnetronilla, minkä seurauksena uunin sisälle muodostuu muuttuva sähkökenttä. Mikroastioissa olevat dipolimomenttiset yhdisteet liikkuvat muuttuvan sähkökentän mukana ja lämpiävät samalla lämmittäen koko näytteen. Mikroaaltouunissa sähkökenttä rajataan Faradayn häkällä. Se estää mikroaaltojen leviämisen ympäristöön uunin etupinnan ikkunasta. Häkki on tiheäsilmäinen verkkorakenne, joka erottuu silmällä tarkastellessa mikroaaltouunia. Kemian laboratoriossa käytettävässä mikroaaltouunissa näytteet pakataan tiiviisiin painetteihin ja korkeaa lämpötilaa kestäviin mikroastioihin, jotka kiinnitetään erilliseen telineeseen. Koska lämpötilan nousu nostaa myös astioiden sisäistä painetta,

näytteitä kontrolloidaan erillisillä antureilla. Näyteastioiden paine ja lämpötila ovat parametrit, joita yleensä tarkkaillaan. Jos anturit havaitsevat epänormaalin suuria arvoja, mikroaaltouuni ilmoittaa asiasta äänekkäästi.⁶³ Mikroaaltouuniavusteisessa hajotuksessa tulee ottaa huomioon käytettävien happojen kiehumispiste. Kun hajotusohjelman maksimi lämpötila asetetaan alle käytettävän hapon kiehumispisteen, työskentely on turvallisempaa kuin lämpötilan ollessa korkeampi kuin hapon kiehumispiste, jolloin mikroastioihin muodostuu liian kova paine ja ne voivat vaurioitua tai haljeta.

Erilaiset hapot ja happoyhdistelmät hajottavat erilaisia materiaaleja. Orgaanista ja epäorgaanista ainesta sisältävien näytteiden hajottamiseen käytetään yleensä typpihappoa (HNO_3) tai sen ja vetyperoksidin (H_2O_2) tai vetyfluoridin (HF) yhdistelmää. Jos näyte sisältää piitä (Si), on HF parempi yhdistelmähappo typpihapon kanssa kuin H_2O_2 , sillä HF hajottaa myös pii-yhdisteitä eli silikaatteja. Heinien soluseinärakenteet sisältävät piitä, siksi hajottavana happoyhdistelmänä on hyvä käyttää HNO_3 :n ja HF:n yhdistelmää.⁶⁴ Jotta välttyttäisiin erilaisilta vaaratekijöiltä, on turvallista tuhkistaa orgaanista ainesta sisältävät näytteet ennen happoliuotusta. Orgaanista ainesta sisältävät näytteet voivat reagoida hyvinkin voimakkaasti happojen kanssa. Tuhkaa pidetään yhtenä vaikeimmista analysoitavista näytteistä, koska liuotukseen voidaan joutua käyttämään useampaa happoa ja hajotusta tehostavaa esikäsittelymenetelmää kuten mikroaaltouunia. Nämä voimakkaat käytössä olevat hajotusmenetelmät eivät kuitenkaan aina takaa näytteen kokonaisvaltaista hajoamista.⁶⁵

7 REHUANALYTIKASSA KÄYTETTÄVIÄ TUTKIMUSMENETELMIÄ

Jotta saataisiin hankituista näytteistä haluttua kemiallista tietoa, on tiedettävä minkä tyyppisiä kemian analyysilaitteita on käytettävä. Eri tekniikoihin perustuvilla analyysilaitteilla kyetään analysoimaan erityyppisiä asioita näytteistä, kuten rakennetta, eri yhdisteiden pitoisuuksia, yhdisteen puhtautta jne. Osa laitteista mittaa kvantitatiivisesti ja osa kvalitatiivisesti. Lisäksi jotkut laitteet mittaavat molempia. Tässä kappaleessa on esitelty erilaisia analyysitekniikoita, joita käytetään rehuanalytiikassa. Analyysilaitteet on esitelty vain niiltä osin, mitä käytettiin tämän pro gradun kokeellisessa osassa.

7.1 Kaasukromatografia helposti haihtuvien yhdisteiden analytiikassa

Kaasukromatografia (GC) on orgaanisten yhdisteiden fyysinen erottelumenetelmä, joka sopii helposti haihtuville yhdisteille. Menetelmässä on kaksi faasia, joista toinen on paikallaan pysyvä

stationäärifaasi, ja toinen liikkuva faasi. Liikkuva faasi kuljettaa näytteen sisältämiä höyrystettyjä näytemolekyylejä kolonnin läpi ja stationäärifaasi jarruttaa tiettyjä ominaisuuksia omaavia molekyylejä vuorovaikuttamalla kaasun mukana liikkuvien yhdistemolekyylien kanssa. Mitä enemmän eroteltavat molekyylit vuorovaikuttavat stationäärifaasin kanssa, sitä hitaammin ne etenevät kolonnissa.

7.1.1 Vertailussa käytetään sisäistä standardia ja näytehavaintojen parantamisessa derivatisointia

Sisäinen standardi lisätään näytteeseen, kun tehdään kvantitatiivinen arvio näytteen sisältämistä yhdisteistä. Standardi valitaan tarkoin etukäteen analysoitavien yhdisteiden perusteella. Sopiva standardi on yhdiste, joka on samankaltainen kuin, yhdisteet mitä tutkitaan. Näyte ei saa sisältää standardia muuten kuin lisättyinä. Sen kromatogrammin tai massaspektrin vaste ei saa sijaita analysoitavien yhdisteiden vasteiden kanssa päällekkäin. Standardivasteen on hyvä sijoittua hieman erilleen erottuakseen paremmin. Sisäisen standardin pitoisuus tiedetään etukäteen. Se annostellaan tarkasti näytteeseen ennen näytteen derivatisointia.^{66c)}

Derivatisoinnissa näytemolekyyleihin yleensä lisätään jonkinlainen derivaatta, jolloin yhdisteistä tulee johdannaisia. Derivatisointi on menetelmä, jolla tutkittavat yhdisteet saadaan paremmin liikkuviksi kolonnissa sekä paremmin näkyviin kuvaajissa. Toisaalta suurten molekyylien massa suurenee entisestään, joten suurimpien yhdisteiden eteneminen kolonnissa hidastuu pienempiä enemmän. Näin eri yhdisteiden retentioajat erottuvat toisistaan paremmin, jonka seurauksena resoluutio paranee. Lisäksi vasteet terävöityvät, jolloin saadaan entistä täsmällisempää tietoa yhdisteistä. Analysoitavat yhdisteet ja detektori määrittävät, mitä derivointireagenssia käytetään. Lisäksi myös muilla kemiallisilla ominaisuuksilla on vaikutusta derivointireagenssin valintaan. Analysoitavan yhdisteen funktionaalinen ryhmä reagoi derivointireagenssin kanssa muodostaen johdannaisen. Tämän pro gradun kokeellisessa osassa derivatisoinnit tehtiin silylointireagenssilla. Silylointi on mahdollista tehdä muun muassa alkoholiryhmään, karboksyylihapporyhmään, tioliryhmään sekä primaariseen tai sekundaariseen aminoryhmään. Derivatisointi voidaan myös tehdä kätevästi alkyloinnilla, asetyloinnilla tai metyloinnilla.^{66c)}

7.1.2 Kaasukromatografian tekniikka lyhyesti

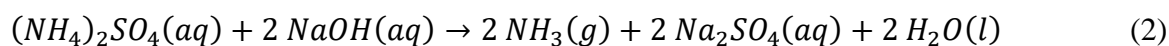
Sopivaan liuottimeen liuotettu näyte syötetään injektorilla injektiouunin lämmittämään injektioammioon, jossa näytteen sisältämät yhdisteet höyrystyvät. Näyteliuosta lämmitetään lämmitysohjelman mukaisesti, jolloin analysoitavat näyteyhdisteet höyrystyvät niiden höyrystymislämpötilan mukaisessa järjestyksessä. Molekyylit siirtyvät samassa järjestyksessä kolonniin, jossa ne erottuvat toisistaan selkeämmin. Kolonnin liikkuvana faasina käytetään helium (He), typpi (N₂) tai vety (H₂) kaasua, jotka ovat stabiileja kaasuja käytetyissä olosuhteissa. Liikkuvaa faasia kutsutaan myös kantokaasuksi. Kantokaasu kuljettaa kolonnin alkuun asennetun injektoriuunin höyrystämiä näytemolekyylejä kuumen kolonnin halki mahdollisimman nopeasti. Kaasuvirtauksen säädöllä pystytään vaikuttamaan näytemolekyylien etenemisnopeuteen kolonnissa. Kolonnin sisäpinnalla on stationäärifaasi, joka voi olla olomuodoltaan nestemäinen, nestemäinen, jossa on kiinteä tukeva peite tai kiinteää.^{66c)} Stationäärifaasi on stabiili ja haihtumaton käytetyissä olosuhteissa sekä sillä on alhainen höyrönpaine ja viskositeetti. Lisäksi se ei reagoi tutkittavien yhdisteiden kanssa ja sen poolisuus on suunnilleen samaa tasoa kuin tutkittavilla yhdisteillä. Kolonnin pituus ja käytettävä lämpötila ratkaisevat yhdisteiden erottelun laadun. Jos kolonni on pitkä, erottuvat tutkittavat molekyylit keskenään huomattavastikin paremmin kuin käyttäessä lyhyempää kolonnia. Ei ole kuitenkaan mielekästä käyttää liian pitkää kolonnia varmistusmielessä, sillä kaasukromatografian perusanalyysiajat ovat pitkät verrattuna muihin menetelmiin, lisäksi resoluutiokaan ei parane määräänsä enempää. Esimerkkinä mainittakoon kasvimateriaalin sisältämien rasvaliukoisten uuteaineiden analysoiminen, jossa käytetään kolonnia, jonka pituus on 30 m. Tällöin yhden näytteen analysointiaika on reilu tunti. Kolonnin sisäpinnan halkaisija voi vaihdella 0,1 – 0,53 mm välillä ja stationäärifaasin paksuus voi vaihdella 0,1 – 5 µm välillä.^{66c)} Kun eroteltavat näyteyhdisteet poistuvat kolonnista, ne liitävät detektorin läpi. Detektorin lämpötila on hieman korkeampi kuin kolonnin, jotta näyteyhdisteet pysyisivät kaasumaisessa muodossa saapuessaan detektorille.³¹ Detektorin keräämä informaatio siirtyy tietokoneelle, jonka ohjelma muuttaa kromatogrammiksi. Kromatogrammi sisältää vasteita, joiden retentioaika on tyypillinen juuri kullekin yhdisteelle.

Kaasukromatografiin voidaan kytkeä useamman tyyppisiä detektoreita. Detektorista riippuu minkä tyyppistä informaatiota yhdistelmälaitteesta saadaan. Seuraavassa esitellään kaksi erilaista detektorityyppiä, joita käytetään myös tämän pro gradun kokeellisessa osassa: Liekki-ionisaatio detektori (FID) ja massaselektiivinen detektori (MSD). FID tunnistaa ainoastaan kvalitatiivisesti ja selektiivisesti yhdisteitä, jotka sisältävät hiili-vetyjä. Yhdisteet poltetaan vety-ilmaseoksella ylläpidettävällä liekillä, jolloin muodostuu hiili-vetyradikaaleja. Hiili-vetyradikaaleista muodostuu

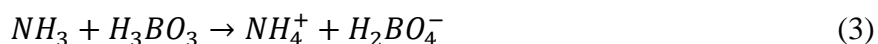
ioneja, jotka aiheuttavat jännitemuutoksen. Havaittu muutos siirretään tietokoneelle, jossa siitä muokataan tietyn tyyppistä dataa. MSD on herkkä detektori, jolla kyetään saamaan sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista informaatiota. Massaspektrometrit erottelevat ionit niiden massa-varaussuhteen (m/z) mukaisesti. Massa-varaussuhde on ionin molekulaarinen paino / varaus. Informaatio muutetaan massaspektriiksi tietokoneella.^{66c)}

7.2 Typpipitoisuuden määrittäminen Kjeldahlin menetelmällä

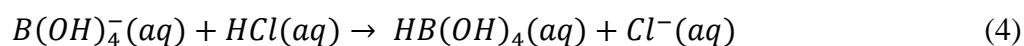
Määrittämissä vaiheissa voidaan käyttää joko tislauksen- titraus tai gravimetristä menetelmää. Tislauksen- titrauksen menetelmän tislauksosiossa polton jälkeen jäädytetyt näytteet laimennetaan hieman vedellä, jonka jälkeen näytteisiin mitataan ylimäärä 40 % natriumhydroksidia (NaOH). Tällöin ammoniakki (NH_3) vapautuu ammoniumsulfaattista reaktioyhtälön 2 mukaisesti.



Seuraavana vaiheena on vesihöyrytislauksen. Siinä vesihöyry siirtää vapautuneen ammoniakkin vastaanottoastiaan, jossa se sidotaan boorihappoon reaktioyhtälön 3 mukaisesti. Boorihappoon lisätyn indikaattorin (bromkresoli-metyylipuna) avulla pystytään tarkkailemaan titrausvaiheessa titrantin kulutus täsmällisen tarkasti. Boorihappo hapettaa ammoniakkin ammoniumioniksi itse pelkistyen reaktioyhtälön 3 mukaisesti.



Viimeisessä vaiheessa liuos titrataan tarkasti standardoidulla 0,1 M vetykloorihapolla (HCl). Titrauksessa tetrahydriksiboraani-ioni hapettuu sitoutumalla vetykloridihaposta dissosioituneen vedyn kanssa reaktioyhtälön 4 mukaisesti.



Kun kaikki tetrahydroksiboraani-ionit ovat hapettuneet tetrahydroksidivetyboraaniksi, on liuoksen väri vaihtunut indikaattorin vaikutuksesta turkoosin sinisestä haaleankeltaiseksi. Titrauksessa kuluneen vetykloridiliuoksen kulutuksen avulla saadaan laskettua näytteen sisältämän typen määrä. Typen kokonaismäärän avulla saadaan arvioitua näytteiden sisältämän raakaproteiinin määrä. Raakaproteiiniarvot ovat laskennallisia ja ne saadaan käyttämällä heinälle kerrointa $6,25^{60}$ ja viljoille $5,70^{62}$.

7.3 Happoon liuenneen ligniinin määrittäminen UV-VIS-menetelmällä

UV-VIS (*Ultraviolet-visible light spectrophotometry*) on erittäin käytetty spektrofotometrinen laite laimeiden kemiallisten liuosten konsentraatioita määrittäessä. Laitteen toiminta perustuu Lambert-Beerin lakiin, jonka mukaan absorptio määrä liuoksessa on suoraan verrannollinen valon kulkemaan matkaan ja liuoksen konsentraatioon. Yhtälössä 1 on esitetty Lambert-Beerin laki, jossa A on absorptio, ϵ on molaarinen absorptiviteetti, joka on jokaiselle yhdisteelle ominainen suure, l on valon kulkeman matkan pituus eli kyvetin halkaisija ja c konsentraatio.

$$A = \epsilon cl \quad (1)$$

UV-VIS on laite, joka mittaa säteilyvoimakkuuden suhdetta, kun monokromaattiset valokvantit suunnataan mitattavan näytteen läpi. Tällöin absorptio noudattaa yhtälöä 2, jossa P_0 on näytteeseen kohdistetun monokromaattisen valon säteilyvoimakkuus ja P näytteestä läpi tulleen valon säteilyvoimakkuus. P_0 :n ja P :n suhde on logaritminen.

$$A = \log \frac{P_0}{P} \quad (2)$$

VIS alueen aallonpituusalue on välillä 400 – 800 nm. Sähkömagneettinen valo, kuten esimerkiksi näkyvä valo ja ultraviolettivalo, koostuu kvanteista eli energiapaketeista. Monokromaattinen valo on ainoastaan yhtä aallonpituutta vastaavaa valoa, jolla on tietty energiamäärä. Monokromaattisen valon avulla näyte viritetään. Molekyylin sisältämistä atomeista jokainen atomi voi absorboida

tyypillisen määrän energiaa ja virittyä tilapäisesti korkeammalle energiatasolle kuin on normaalitilassa, kun virittyminen tapahtuu elektronit siirtyvät perustilalta (HOMO) viritystilalle (LUMO).^{66a)} UV alueen aallonpituusalue on välillä 110 – 400 nm. Laite mittaa molekyylin virittymiseen käytettävän kvantin energian sekä virittymisen yhteydessä molekyylistä poistuvan kvantin energian. Heinäkasveilla käytetään mittausaallonpituutta (λ) 205 tai 280 nm, kun mitataan happoon liunneen ligniinin pitoisuutta. Laitteessa olevan mittaustilan tarvitsee olla ehdottoman pimeä, sillä mittaus vääristyy, jos sinne pääsee valoa. Valonlähteenä UV-alueella käytetään deuteriumlamppua ja näkyvän valon alueella volframi- tai volframi-halogeenilamppua.

7.4 Makro- ja mikromineraalien määrittäminen ICP-OES-menetelmää käyttäen

ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*) on spektrimetrisen laite kuten UV-VIS. ICP-OES tekniikan avulla kyetään määrittämään alkuaineita näytteestä nopeasti yhdellä kertaa.^{66b)} Sillä kyetään mittaamaan reilun 70 eri alkuaineen pitoisuudet liuoksesta.^{66b),67} Kyseisiä alkuaineita voidaan mitata vaihtoehtoisesti erikseen tai yhtäaikaisesti. Pääasiassa määritettävät alkuaineet ovat metalleja, etenkin siirtymäalkuaineita, mutta myös joitain epämetalleja. ICP-OES on hyvin suosittu alkuaineanalyysilaitte ja soveltuu erinomaisesti ruoka-aineiden ravinneanalytiikkaan, mutta myös moniin muihin alkuaineanalyysiin. Laitteen yhtenä osana monipuolisuutta on mahdollisuus analysoida näyteliuoksen alkuainepitoisuudet semikvantitatiivisesti eli suuntaa-antavasti. Tuloksiin nojaten voidaan suunnitella varsinainen mittaus hyvinkin tarkasti etenkin, kun ei tiedetä etukäteen alkuainepitoisuuksista mitään. Semikvantitatiivisista tuloksista nähdään alkuaineiden mittausalue, jonka perusteella kyetään suunnittelemaan kalibraatioalue jokaiselle alkuaineelle yksilöllisesti etenkin, kun mittaus suoritetaan monialkuaineanalyysiä käyttäen. ICP-OES -tekniikalla mitattavien alkuaineiden lineaarinen pitoisuusalue on 10^5 .⁶⁷

7.4.1 ICP-OES-laitteen toiminnan perusteet

ICP-OES pohjautuu höyryn sisältämien atomien konsentraation mittaamiseen karakterististen emissioaallonpituuksien jakaumaan. ICP-OES -laitteiston atomisaatiomenetelmänä käytetään plasmaa, joka mahdollistaa laajan ja monipuolisen alkuainemäärittämisen. Eri alkuaineiden mittaus tapahtuu yhtäaikaisesti. Plasma on keskeinen tapahtumapaikka, jossa prosessin päätteeksi näyteatomit virittyvät hetkellisesti ja virittymisen purkautuessa atomit emittoivat karakteristista

säteilyä. Emittoituneet kvantit havaitaan detektorilla, mitä enemmän samaa alkuainetta näyte sisältää sen suurempi intensiteetti havaitaan alkuaineille tyypillisillä aallonpituuksilla. Laite mittaa emissiot optisella alueella eli sekä ultraviolett- että näkyvänvalon alueella 160 – 900 nm.⁶⁷

7.4.2 Onnistunut mittaus ja kalibrointi

Onnistuneen mittauksen edellytyksenä on erilaisten mittausparametrien oikea valinta. Kun mittausolosuhteet optimoidaan mahdollisimman tarkasti, saadaan mahdollisesti parhaat tulokset. Mittausparametrien riippuvuus toisistaan luo haasteita optimoinnille etenkin, kun suoritetaan monialkuaineanalyysiä. Monta muuttujaa vaikuttaa moniin asioihin, mikä luo monimutkaisen haasteen, jonka pohjalta on hyvä harkita myös laitevalmistajan suosituksia mittaukselle.

Ennen kuin ICP-OES -laite käynnistetään mittausta varten, on hyvä tarkistaa letkujen ja liittimien silmämääräinen kunto, varmistaa sumuttimen ja sumutinkammion tarkoituksenmukaisuus ja oikeellisuus omille näytteille. Lisäksi voidaan valita mitattavien alkuaineiden mittausaallonpituudet ja täyttää valmiiseen ohjelmopohjaan näytteisiin liittyvät parametrit. Sen jälkeen, kun laite on käynnistetty onnistuneesti, voidaan siirtyä tarkastelemaan muita mittaukseen liittyviä parametrejä. Plasmaan optimaaliseen toimintaan ja visuaaliseen eleettömyyteen liittyviä parametrejä ovat sumutinkaasun virtausnopeus sekä mittauskorkeus. Mittauskorkeuden lisäksi ICP-OES laitteessa voidaan valita mittaissuunta. Mittaus voidaan suorittaa valinnaisesti joko radiaalisesti (plasmaan nähden vertikaalisesti) tai aksiaalisesti (plasman suuntaisesti). Mittaus on myös mahdollista suorittaa molemmista suunnista yhtäaikaisesti.⁶⁷ Suunnan valinnalla on merkitystä mittauksen onnistumiselle. Aksiaalisella mittauksella saavutetaan alhaisemmat toteamisrajat.⁶⁸ Edellinen virke tukee ajatusta, että liuoksen sisältäessä alhaisia pitoisuuksia tiettyjä alkuaineita, aksiaalinen mittaussuunta on niiden kohdalla parempi vaihtoehto kuin radiaalinen. Molempien mittaussuuntien käyttö tulee kysymykseen vain, kun happotausta on erittäin monimutkainen.⁶⁷ Jotta plasman toiminta mittauksien aikana olisi mahdollisimman moitteetonta, on erittäin tärkeää tarkistaa plasman viritys optimaaliseksi. Plasman viritysominaisuudet halutaan robusteiksi olosuhteiksi. Robustit olosuhteet tarkastetaan käyttämällä J-M. Mermetin kehittelemää testiä. Siinä verrataan magnesiumin tiettyjen aallonpituuksien emissiosignaaleja keskenään. Niiden suhteen ollessa yli 8 ovat olosuhteet robustit.⁶⁹

Kun tehdään tarkka alkuaineanalyysi, tarvitaan vertailukohde, johon näytteitä verrataan. ICP-OES-laitteella käytetään vertailukohteena kalibrointisuoraa. Kalibrointisuoran hahmottamiseksi

voidaan käyttää multistandardista alkuainekantaliuosta tai valmistaa yksilöllisesti juuri omille näytteille tarkoitettu, tarkasti mitattu standardikantaliuos. Valitusta kantaliuoksesta laimennetaan näytteille juuri sopivat, tarpeeksi laaja skaala eri pitoisuuden omaavia näytteitä. Lisäksi tarvitaan nolla-näyte, joka sisältää näytteen käsittelyssä käytetyt reagenssit. Nollanäytteen ja eri pitoisten standardiliuosten taustan happopitoisuudet pitää olla samat kuin näytteillä. Happotausta vaikuttaa myös mittaustuloksiin. Kalibrointisuoraa varten valmistetaan vähintään kolme liuosta, mutta on järkevämpää valmistaa useampi liuos, koska kalibraatiosuoran tarkkuus kasvaa. Toisaalta tarvittaessa voidaan poistaa jokin pitoisuus välistä sen epätarkkuuteen perustuen. Standardiliuoksien määrää ei kuitenkaan ole järkevää lisätä yli kuuden kappaleen, sillä tarkkuus ei enää kuuden liuoksen jälkeen juurikaan parane. Kalibraation avulla määritetään analyttiselle kemialle tyypilliset vertailuarvot: menetelmän toteamisraja (LOD) ja määrittämisraja (LOQ). LOD on alhaisin tilastollisesti merkittävästi nolosta poikkeava pitoisuus. LOQ-arvoa suuremmilla pitoisuuksilla analyytit voidaan määrittää kvantitatiivisesti. LOD ja LOQ lasketaan yleisesti nollaliuoksen standardipoikkeamien ja kulmakertoimen avulla. Mittauskertojen määrä on oltava riittävä.

7.4.3 ICP-OES-tekniikka lyhyesti

ICP-OES -laitteistoon kuuluu näytteensyöttöjärjestelmä, plasma, optiikka ja detektori. Näytteensyöttö ja plasma sijaitsevat ICP-osassa ja optiikka ja detektori OES-osassa. Osat ovat liitettynä sulavasti toisiinsa, joten koko paketti mahtuu samaan laitetilaan. Näytteensyöttöjärjestelmä syöttää näytteen plasmaan, vaikuttamatta plasman stabiilisuuteen tai näytteestä saataviin signaaleihin. Näytteensyöttöjärjestelmän osia ovat automaattinen näytteensyöttäjä, pumppu, sumutin ja sumutinkammio. Näytteensyöttäjä ja pumppu siirtävät mahdollisimman tasaisesti ja tietyllä nopeudella näyteliuosta kohti suutinta. Sumuttimella ja sumutinkammioilla on erittäin suuri merkitys näytteen esikäsittelyssä kohti plasmaa. Sumutin hajottaa näytteensyöttäjältä pumpun avustamana siirtyneen nestemäisen näytteen, pieniksi pisaroiksi. Sumutin puhaltaa argonkaasussa näytepisarat sumutinkammioon, jossa ne erottuvat niin, että vain pienimmät pisarat jatkavat aerosolina matkaa kohti plasmaa. Suuret pisarat poistuvat kammioista erillistä reittiä pitkin jäteastiaan. Sumuttimen oikea valinta takaa, että se toimii asianmukaisesti tukkeutumatta ja sumuttaa mahdollisimman pienipisaraista näytesumua sumutinkammioon koko mittauksen ajan. GemCone on monipuolinen ja usein käytetty sumutin. Se sietää suuriakin suolapitoisuuksia. GemCone -sumuttimen kanssa käytetään yleisesti syklonista sumutinkammiota. Sykloninen sumutinkammio voi olla lasinen tai muovinen.

Induktiivisesti kytketyn plasman energiaa pidetään yllä RF -generaattorilla (RF = radio frequency). Plasma synnytetään ulkoisella radiotaajuisella magneettikentällä, jossa ylläpitokaasuna käytetään yleensä stabiilia jalokaasua argonia⁶⁷. Plasma on ionisoitunutta kaasua, jonka lämpötila mittausalueella on noin 7000 K. Korkea lämpötila takaa aerosolin nopean haihtumisen.^{66b)} Plasman lämpö haihduttaa näyteliuottimen, näyte höyrystyy ja atomisoituu sekä lopulta osa atomeista ionisoituu. Plasmassa argon on positiivisesti varautunut, lisäksi siellä liikkuvat argonista ionisoitumisen yhteydessä irronneet negatiiviset elektronit itsenäisesti. Elektromagneettinen kenttä saa aikaan ionien liikkeen ja kiihtyvyyden. Liike aiheuttaa törmäilyjä argonionien elektronien ja näyteatomien välillä, jolloin näyteatomit ja ionit virittyvät.⁶⁷ Virittyneet näyteatomit ja -ionit emittoivat eri alkuaineille tyypillisiä valokvantteja, joilla on tietyt aallonpituudet, kun viritystilat purkautuvat. Monilla alkuaineilla on useita aallonpituuksia, joilla havaitaan niiden läsnäolo. Eri energiset valokvantit ohjataan peilien avulla polykromaattorille (sis. Eshelle-hilat), jossa valosta kootaan sädekimppuja ja erotellaan tietyt aallonpituudet, jotka suunnataan dispersiolevylle. Siellä UV-valon ja näkyvän valon sädekimput eriytetään toisistaan, minkä jälkeen tapahtuu signaalien kerääminen kahdelle eri detektorille.

8 TILASTOLLISET LASKENTAMENETELMÄT

Kemiallisista analyyseistä saatuja tuloksia tarkastellaan usein tilastollisilla matemaattisilla menetelmillä, jotta voida verrata eri näytteiden tuloksia keskenään pohtia poikkeamien syitä. Näytetuloksille lasketaan keskiarvot ja standardipoikkeamat.

Keskiarvo \bar{x} lasketaan kaavalla (3). Kaavassa x_i = mittaustulos ja n = otosten lukumäärä.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i}{n} \quad (3)$$

Standardipoikkeama s lasketaan kaavalla (4).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4)$$

Rinnakkaisnäytteiden tuloksissa voi toisistaan poikkeavia arvoja. Tällöin ulkopuolisten arvojen poistamisen arvioimiseen voidaan käyttää IUPAC:in suosittelemaa Grubbs'in testiä, joka lasketaan kaavalla (5). Testissä arvioidaan epäillyn arvon q_s ja keskiarvon erotusta suhteessa standardipoikkeamaan.

$$G = \frac{|q_s - \bar{x}|}{s} \quad (5)$$

Saatua tulosta verrataan kriittiseen taulukkoarvoon G ($P = 0,05$). Jos laskettu tulos on suurempi kuin taulukkoarvo, voidaan rinnakkaisnäytteen tulos poistaa ulkopuolisena tuloksena. Taulukkoarvot on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Kaksisuuntainen Grubbs'in kriittinen arvo ($P = 0,05$)⁷⁰

Rinnakkaisnäyttemäärä	Kriittinen arvo
3	1,155
4	1,484
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126

Mineraalien määrittämisessä tärkeänä osana kalibraation ja näytteistä saatujen tulosten yhteyttä, ovat LOD- ja LOQ-arvot. LOD lasketaan kaavalla 7

$$LOD = \frac{3s_b}{b}, \quad (7)$$

ja LOQ kaavalla 8

$$LOQ = \frac{10s_b}{b}. \quad (8)$$

KOKEELLINEN OSA

9 TUTKIMUKSESSA KÄYTETYT LAITTEET, REAGENSIT JA NÄYTTEET

Kokeellisessa osassa tutkittiin hevosille annettavan korsirehun ja yleisesti väkirehuna syötettävän kauran tärkeimpien ravintoaineiden pitoisuuksia. Lisäksi tutkittiin hevosen ruuansulatuksen seurauksena ravintoainepitoisuuksien muutoksia lannan sisältämiä ravintoainepitoisuuksia apuna käyttäen. Työssä määritettiin orgaanisista yhdisteistä rasvahappojen, sokerien, hiilihydraattimonomeerien, ligniinin sekä typen määrät. Analyysitulosten perusteella laskettiin raakaproteiinin sekä NDF ja ADF määrät eri näytteissä. Lisäksi määritettiin yleisimpien epäorgaanisten makro- ja mikromineraalien pitoisuudet.

9.1 Tutkimuksessa käytetyt laitteet

Eri työosioissa käytettiin eri laitteita. Kaikki tutkielmassa käytetyt laitteet on esitetty taulukossa 2. Taulukko sisältää myös laitteiden mallit sekä työvaiheet, jossa tai joissa kyseistä laitetta käytettiin.

Taulukko 2. Tutkielmassa käytetyt laitteet

Laite	Työvaihe	Malli
Lämpökaappi	Näytteiden kuivaus	Memmert
Mylly	Heinä- ja kauranäytteiden jauhaminen	Retsch SM 100
Mylly	Lantanäytteiden jauhaminen	Fritch Pulverisette
Muhveli	Tuhkistus	Nabertherm, Naber
Uuttolaite	Uuteaineiden määrittäminen	Soxhlet, Gerhardt
Ultraäänilaite	Uuteaineiden määrittäminen, mineraalien määrittäminen	Ultrasonic Cleaner
Pyöröhaihdutin, helposti haihtuvat liuottimet	Uuteaineiden määrittäminen, happohydrolyysi	Büchi Ika HB10
Pyöröhaihdutin, vaikeasti haihtuvat liuottimet	Uuteaineiden määrittäminen	Heidolph VV 2000
GC-FID	Uuteaineiden määrittäminen	Agilent 6850 Series
GC-MSD	Uuteaineiden määrittäminen	Agilent 5973 Series
Vesihaude	Happohydrolyysi	Büchi Water bath B-480
Imu-vesikierrätin	Happohydrolyysi	Heto Master Jet
UV - VIS	Happohydrolyysi	Beckman DU 640
pH-mittari	Happohydrolyysi	Mettler Toledo
Magneettisekoittaja	Happohydrolyysi	Heidolph MR Hei-Standard
Autoklaavi	Happohydrolyysi	Melag Autoglav 23
GC	Happohydrolyysi	Shimadzu GC-2010.
Kjeldahlin laitteisto	Typen määrittäminen	P-Selecta BLOCK DIGEST 12 ja R.A.T sekä PRONITRO I
Mikroaaltouuni	Mineraalien määrittäminen	CEM Mars 5 ja 6 one touch technology sekä Anton Paar Multiwave Go
ICP-OES	Mineraalien määrittäminen	Perkin Elmer Optima 8300

9.2 Tutkimuksessa käytetyt reagenssit

Työ sisälsi erittäin monta työvaihetta. Eri vaiheissa käytettiin erityyppisiä reagensseja. Kaikki työssä käytetyt reagenssit on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Tutkielmassa käytetyt reagenssit

Reagenssi	Puhtausaste, %	Valmistaja
Heksaani (C₆H₁₄)	98	VWR Chemicals
Denaturoitu etanoli (C₂H₅OH)	99,5	Altia
Asetoni (C₃H₆O)	99,8	VWR Chemicals
Rikkihappo (H₂SO₄)	95,0 – 97,0	Sigma-Aldrich
Natrium hydroksidi (NaOH)	kiinteä	VWR Chemicals
Boorihappo (H₃BO₃)	kiinteä	Merck
Vetykloridihappo (HCl)	37	Sigma-Aldrich
Typpihappo (HNO₃)	≥65	Sigma-Aldrich
Vetyfluoridihappo (HF)	40	Merck
Kjeldahl-tabletit, 3,5 g	kiinteä	Merck

9.3 Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden taustatiedot

Työssä käytettyjen näytteiden keräys tapahtui yhdeltä hevostilalta. Säilöheinärehu- sekä kauranäyte olivat paikallisviljelijän säännöllisesti toimittamia koeryhmän hevosten perusrehuja. Kuivaheinä oli hankittu muualta Pirkanmaalta varta vasten tätä koetta varten. Korsirehut sisälsivät pääasiassa Timotei -heinää, kummankaan korsirehuerän sisältämistä muista mahdollisista heinälajikkeista ei ollut tietoa. Koehevosryhmä asui Sappeen Ratsutila Oy:n tiloissa Pirkanmaalla Luopioisissa. Hevoset olivat hyväkuntoisia ja ne ulkoilivat sekä liikkuivat säännöllisesti päivittäin. Ryhmään kuului yhteensä kuusi yksilöä: kolme tammaa ja kolme ruunaa. Muiden ominaisuuksien suhteen, kuten rodun, koon ja iän perusteella ryhmä oli jakautunut hyvin heterogeenisesti. Hevoset numeroitiin. tammot olivat numerot 1 – 3 ja ruunat 4 – 6. Hevosten iät olivat hevosnumerojärjestyksessä 24, 17, 9, 14, 9 ja 7 vuotta.

Korsirehunäytteiden taustatekijät olivat myös kiinnostavia asioita, sillä niiden oletettiin vaikuttavan rehun ravitsemukselliseen laatuun. Säilöheinä korjattiin pellolta, joka oli heinäviljelyssä jo kolmatta kesää. Sitä ei ollut lannoitettu keväällä. Pellossa oli käytetty lehmänlantaa heinän viljelyn ensimmäisenä kautena, muuten sitä ei ollut lannoitettu. Säilöheinä korjattiin heinäkuussa 2016 viikolla 28, mikä oli reilusti heinän kukinnan jälkeen. Säilöheinä oli esikuivattua, se paalattiin suuriksi pyöröpaaleiksi kaksi vuorokautta niiton jälkeen. Säilöntään käytettiin maitohappobakteereita, mikä edellytti muovikelmuun pakkauksen sekä käyttöönotonviiveen. Kuivaheinä niitettiin myös viikolla 28 ja paalattiin noin 10 kg painoisiin perinteisiin pikkupaaleihin. Viljelijä ei halunnut kertoa mitään rehun kuivausajasta eikä pellon lannoitteista. Kesän sateet

viivästyttivät yleisesti korjuuta Pirkanmaalla kesällä 2016. Lisäksi huomioitavaa oli se, että hevosten karsinoissa käytettiin turvekuiviketta. Osa tai kaikki koeryhmän hevoset todennäköisesti söivät sitä myös tutkittavien dieettien aikana.

Hevosia ruokittiin näytterehuilla yhteensä 10 vuorokautta. Kumpaakin korsirehua syötettiin viisi vuorokautta. Hevoset saivat korsirehua kolme ateriaa päivässä. Lisäksi hevosille annettiin kaksi ateriaa vedellä kostutettua kokokauraa päivässä. Kunkin hevonen sai kehonpainoon, -rakenteeseen ja työmäärään suhteutetun määrän rehuja. Muiden rehujen antaminen koehevosille lopetettiin dieettien ajaksi. Lannat kerättiin kertakäyttöhansikkailla pusseihin karsinoista kolmen vuorokauden kuluttua dieetin aloittamisesta. Lanta pyrittiin valikoimaan mahdollisimman puhtaana karsinan kuivikkeesta.

10 NÄYTTEIDEN ESIKÄSITTELY, ANALYSOINTI JA TULOKSET SEKÄ TULOSANALYYSI JA VERTAILU

Ensimmäinen työvaihe oli kaikkien näytteiden kuivaus. Molemmat korsirehunäytteet sekä kauranäyte kuivattiin ilmakeivaksi lämpökaapissa 50 °C lämpötilassa yön yli (kuva 11). Kuivauksen jälkeen rehut jauhettiin myllyllä, jonka teränä käytettiin 1 mm leikkuuterää. Vastaavasti lantanäytteet kuivattiin kuiviksi lämpökaapissa 105 °C lämpötilassa. Kosteana ne olisivat mahdollisesti aiheuttaneet hajuhaitan. Kuivauksen jälkeen lantanäytteet jauhettiin myllyllä. Teränä käytettiin 1 mm terää. Ilmakeivatut näytteet säilytettiin erillisissä hyvin merkatuissa ja yhä uudelleen suljettavissa pusseissa. Ilmakeivatuista näytteistä määritettiin kuiva-ainepitoisuudet kuivamalla niitä 24 tuntia 110 °C lämpötilassa (Liite 1).

Tämän tutkielman kaikki laskutoimitukset laskettiin Microsoftin Excel-laskentaohjelmalla. Liitteissä 1 - 5 on esitetty esimerkki jokaiseen analyysiin sisältyvistä laskutoimituksista. Esimerkinäytteenä käytettiin säilöheinän rinnakkaisnäyte numeroa 1.

Tutkielmassa käytettiin pääasiassa pitoisuuden yksikkönä gramma per kilogramma kuiva-ainetta (ka). Poikkeuksena olivat vain mikromineraalit, koska niiden pitoisuudet olivat alhaiset.



Kuva 11. Rehujen kuivaus lämpökaapissa alkamassa.

10.1 Uuteaineiden määrittäminen liuotinuutolla

Uuteaineet ovat orgaanisia yhdisteitä, joita uutetaan yleensä näytteestä liuottimella, joka on poolisuudeltaan samankaltainen kuin uutettavat yhdisteet. Uuton tehostamiseksi ja nopeuttamiseksi voidaan käyttää erilaisia laitteita ja välineitä.

10.1.1 Uuteaineiden eristäminen Soxhlet -uutomenetelmällä

Tässä tutkielmassa uuteaineet eristettiin näytteistä Soxhlet -uutomenetelmää käyttäen (kuva 12.). Säilöheinää (SH), kuivaheinää (KH) ja kauranäytettä (K) analysoitiin kaksi rinnakkaista näytettä. Eri hevosten (1 – 6) lantanäytteet toimivat toistensa rinnakkaisina näytteinä. Rasvaliukoiset uuteaineet eristettiin eri liuottimella kuin vesiliukoiset. Rasvaliukoisista uuteaineista mielenkiintoisimmat olivat vapaat pitkäketjuiset rasvahapot ja vastaavasti vesiliukoisista liukoiset sokerit ja etenkin glukoosi ja fruktoosi. Näytteitä punnittiin hieman eri määrät, koska oletettiin, että uuteaineiden määrä oli vähäisempi lannassa kuin ravinnossa (korsirehut ja kaura).



Kuva12. Lantanäytteiden heksaaniuutto Soxhlet -uuttolaitteella.

10.1.1.1 Rasvaliukoiset uuteaineet

Lanta- ja kauranäytteitä punnittiin 1,9 g ja heinänäytteitä 1,7 g suoraan uuttohylsyyn. Rasvahappojen uuttoon käytettiin liuottimena poolitonta heksaania. Heksaania mitattiin 150 ml pyörökolviin. Uuttamiseen käytettiin aikaa 4 tuntia. Uuton jälkeen uuttoliuos kondensoitiin pyöröhaihduttimella, kunnes kolvin pohjalla oli noin 1 ml kondenssia. Näyte huuhdeltiin Kimax-putkeen vähäisellä heksaanimäärällä, kiehumakivet jäivät kolviin. Heksaani haihdutettiin kuivaksi typpivirtauksella, kuivattu jäännös punnittiin ja liuotettiin asetoniin ultraäänilaitetta apuna käyttäen. Liuennet näytteet siirrettiin mittapulloihin ja täytettiin asetonilla mittatilavuuteen. Säilöheinä-, kuivaheinä- ja kauranäytteet laimennettiin 50 ml, säilöheinän lantanäytteet 50 ml:ksi ja kuivaheinän lantanäytteet 25 ml:ksi.

10.1.1.2 Vesiliukoiset uuteaineet

Lanta- ja kauranäytteitä punnittiin 1,9 g ja heinänäytteitä 1,7 g suoraan uuttohylsyyn. Liukoisten sokerien uuttoon käytettiin liuottimena 67,5 % etanolia (C_2H_5OH), joka oli laimennettu UHQ-vedellä 99,5 % denaturoidusta etanolista. Etanoli-vesiliuosta mitattiin 150 ml pyörökolviin.

Uuttamiseen käytettiin aikaa 5,5 tuntia. Uuton jälkeen liukoiset uuteaineet kondensoitiin pyöröhaihduttimella. Kondensointia jatkettiin kunnes kolvin pohjalla oli noin 1 ml näytettä. Näytteet siirrettiin Kimax-putkiin, huuhtelu tehtiin pienellä määrällä 67 % etanolia. Näytteet kuivattiin typpivirtauksella kuiviksi. Kuivaukseen meni useita päiviä. Kuivatut näytteet punnittiin, jonka jälkeen ne liuotettiin UHQ -veteen ja siirrettiin mittapulloihin. Pullot täytettiin mittaan UHQ -vedellä. Kaikki näytteet laimennettiin 100 ml mittapulloon. Tämän jälkeen säilöheinä- (SH) ja kuivaheinänäytteet (KH) laimettiin 1/2.

10.1.2 Uuteaineiden analysointi

Laimennetuista näytteistä suodatettiin suodattimella Supreme PTFE 0,45 mm (Teflon) 2 ml suoraan Kimax-putkeen. Näytteiden sekaan lisättiin 1 ml sisäiseksi standardiksi betulinolia, jonka pitoisuus oli 0,1 mg/ml. Näytteet kuivattiin kuiviksi typpivirtauksessa. Kuiviin näytteisiin lisättiin derivatisointia varten pyridiiniä 0,7 ml ja silylointireagenssia (99 % BSTFA + 1 % TMCS) 0,3 ml. Kimax-putket suljettiin korkeilla ja laitettiin lämpökaappiin 60 min ajaksi 70 °C lämpötilaan. Derivatisoidut näytteet siirrettiin vialleihin ja analysoitiin kaasukromatografilla. Kolonnina käytettiin Agilent HP-5, jonka mitat olivat 30 m x 0,32 mm i.d. ja filmin paksuus 0,25 µm. Menetelmänä käytettiin UUTEAIN1.M. Injektiotilavuutena oli 1 µl.

10.1.3 Rasvahapot ja niiden pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu

Säilöheinän sisältämät vapaat rasvahapot ja niiden keskiarvoiset pitoisuudet standardipoikkeamiseen on esitetty taulukossa 4 (Liite 2). Ravintonäytteitä (korsirehut ja kaura) analysoitiin 2 rinnakkaisnäytettä ja hevosityksilöiden lantanäytteet olivat toistensa rinnakkaisnäytteet.

Taulukko 4. Näytteiden sisältämät rasvahapot ja niiden pitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Rasvahappo	Säilöheinä	Säilöheinälanta	Kuivaheinä	Kuivaheinälanta	Kaura
Palmitiinihappo	0,340 ± 0,006	1,4 ± 0,4	0,39 ± 0,06	0,83 ± 0,3	0,289 ± 0,014
Heptadekaanihappo		0,12 ± 0,02		0,09 ± 0,02	
Steariinihappo	0,064 ± 0,009	2,7 ± 1,1	0,056 ± 0,002	1,9 ± 0,7	0,051 ± 0,002
Arakidiinihappo	0,032 ± 0,001	0,11 ± 0,04	0,026 ± 0,003	0,08 ± 0,02	0,02308 ± 0,00012
Öljyhappo		0,32 ± 0,06		0,23 ± 0,11	0,48 ± 0,03
Eikosaeenihappo	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,01 +	0,182 ± 0,012
Linolihappo	0,29 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,065 ± 0,03	0,39 ± 0,03
α-linoleenihappo	0,65 ± 0,03		0,61 ± 0,13		
YHTEENSÄ	1,52	4,75	1,69	3,29	1,41

+ näytteessä havaittiin yhdistettä, pitoisuutta ei kyetty määrittämään.

Rasvahapot kuuluvat hevosen luontaisen ravintoon, sillä kasvit tuottavat rasvahappoja omaan käyttöönsä. Ravintolähteiden vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuus (Taulukko 4) oli kaikissa ravintolähteissä samalla tasolla. Säilöheinässä pitoisuus oli 1,52 g kg⁻¹ ka, kuivaheinässä 1,69 g kg⁻¹ ka ja kaurassa 1,41 g kg⁻¹ ka. Yksittäisille rasvahapoille laskettiin keskiarvojen lisäksi standardipoikkeamat. Korsirehun sisältämien yksittäisten vapaiden rasvahappojen pitoisuudet olivat rinnakkaisnäytteissä pääsääntöisesti keskenään samalla pitoisuustasolla. Niistä erottui kuitenkin yksi rasvahappo, α-linoleenihappo, jonka rinnakkaispitoisuudet poikkesivat toisistaan. Niiden standardipoikkeama oli 0,13, mikä oli huomattavasti suurempi kuin muiden rasvahappojen. Vertailtaessa korsirehujen eri rasvahappojen pitoisuuksia keskenään, huomattiin rasvahappopitoisuuksissa olevan korkeintaan kymmenien milligrammojen eroja, joten korsirehunäytteiden vapaiden rasvahappojen koostumus oli hyvin samankaltainen molemmissa rehuerissä. Säilöheinä sisälsi tyydyttymättömiä (eikosaeenihappo) ja monitydyttymättömiä (linoli ja α-linoleenihappo) rasvahappoja 71 %, kuivaheinä 72 % ja kaura 74 %. Loput vapaista rasvahapoista oli tyydyttyneitä (palmitiini-, steariini- ja arakidiinihappo) rasvahappoja. Korsirehujen välttämättömien rasvahappojen α-linoleenihapon (C18:3) ja linolihapon (C18:2) pitoisuudet yhdessä kattoi 2/3 vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuudesta. Kauranäytteestä saatiin määritettyä öljyhapon pitoisuus, mutta α-linoleenihapon pitoisuutta ei kyetty määrittämään. Kauran sisältämien vapaiden öljyhapon ja linolihapon yhteispitoisuus oli myös lähellä 2/3 näytteen sisältämien vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuudesta.

Lantanäytteet sisälsivät jäänteet sekä korsirehuista että kaurasta. Kauran osuus päivän kokonaisruokamäärän painosta on noin 10 %. Koska kauran määrä ruokavaliassa oli vähäinen ja sen sisältämien rasvahappojen pitoisuudet olivat hyvin samankaltaiset kuin korsirehujen,

vertaaminen kauran sisältämien rasvahappojen pitoisuuksiin jätetään erikseen tekemättä. Lantanäytteiden sisältämien vapaiden rasvahappojen keskiarvoiset kokonaispitoisuudet (Taulukko 4) olivat säilöheinälannassa $4,75 \text{ g kg}^{-1}$ ka ja kuivaheinälannassa $3,29 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Yksittäisten rasvahappojen pitoisuudet eri hevosten lantanäytteissä vaihtelivat jonkin verran. Eniten vaihtelua esiintyi palmitiini ja steariinihappojen pitoisuuksissa. Lantanäytteiden sisältämistä vapaista rasvahapoista säilöheinälannassa oli 91 % ja kuivaheinälannassa 88 % tyydyttyneitä (palmitiini-, heptadekaani-, steariini- ja arakidiinihappo) rasvahappoja, loput olivat tyydyttymättömiä ((öljy- ja eikosaeenihappo) tai monitydyttymättömiä (linolihappo). Huomattavaa oli, että kummankin lantaerän analyysissä havaittiin heptadekaanihappoa (C17:0) sekä öljyhappoa (C18:1). Palmitiinihapon (C16:0) ja steariinihapon (C18:0) pitoisuudet olivat korkeimmat ja niiden yhteispitoisuus kattoi yli 80 % vapaiden rasvahappojen keskiarvoisesta kokonaispitoisuudesta molemmissa näytteissä.

Säilöheinälannan vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuus (Taulukko 4) oli hieman vajaat 1,5-kertainen kuivaheinälannan pitoisuuteen nähden. Huomattavaa oli, vaikka kuivaheinän kokonaisrasvahappopitoisuus oli suurempi kuin säilöheinän, kuitenkin kuivaheinälannat keskiarvoisesti sisälsivät vähemmän rasvahappoja kuin säilöheinälantanäytteet. Vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuus oli kasvanut, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi. Sen lisäksi rasvahappokoostumus oli muuttunut huomattavastikin. Karkeimpana havaintona oli, että tyydyttyneiden ja eriasteisesti tyydyttymättömien rasvahappojen suhteet olivat muuttuneet päinvastaisiksi. Rehujen monitydyttymättömien rasvahappojen pitoisuudet oli laskenut huomattavastikin. Rehuissa suuripana pitoisuutena esiintyvää α -linoleenihappoa ei havaittu lantanäytteissä lainkaan. Vastaavasti lannassa esiintyi heptadekaanihappoa ja tyydyttymättömyysasteeltaan matalinta 18 hiilen rasvahappoa, öljyhappoa. Öljyhappoa ei havaittu korsirehuissa lainkaan, mutta sitä oli kuitenkin kaurassa. α -linoleenihapon ja öljyhapon intensiteettivasteet olivat eri kohdilla rehujen ja lantanäytteiden kromatogrammeissa, joten ne tulkittiin eri yhdisteiksi. Rasvahappojen kromatogrammien tulkinnassa käytettiin apuna Wileyn kirjastoa.

Koeryhmän tammot olivat hevoset 1 – 3 ja ruunat 4 – 6. Tarkasteltaessa lantanäytteiden sisältämien vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuuksia (Taulukko 4), ei huomattu olevan minkäänlaista sukupuolijakaumaa. Pitoisuuksien vaihtelu eri hevosten välillä oli satunnaista. Tutkiessa lantanäytteiden sisältämien vapaiden rasvahappojen kokonaispitoisuuksia havaittiin, että hevosen numero 1 kokonaisrasvahappopitoisuus oli alhaisin kummassakin lantaerässä, säilöheinälannassa $2,93 \text{ g kg}^{-1}$ ka ja kuivaheinälannassa $1,94 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Vastaavasti hevosen numero 4 lannan

rasvahappopitoisuus oli molemmissa näyte-erissä korkein, säilöheinälannassa $6,75 \text{ g kg}^{-1}$ ka ja kuivaheinälannassa $4,68 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Hevosten 1 ja 4 lantojen sisältämien rasvahappojen kokonaispitoisuuksilla oli huomattava 40 % ero. Nämä kaksi hevosta olivat kooltaan ryhmän pienin ja kookkain. Hevonen numero 1 oli ryhmän pienin hevonen ja hevonen numero 4 kookkain. Säilöheinälantojen yksilöllisissä kokonaisrasvahappopitoisuuksissa oli suurempaa vaihtelua kuin kuivaheinälannoissa.

Rasvahappokoostumuksen muutokselle löytyy selitys hevosen ruuansulatuskanavan toiminnasta. Hevosen ohutsuolessa, primaarisessa ravinteiden imeytymispaikassa, ravinnon rasvahapot imeytyvät hevosen elimistöön. Tämän tutkielman tuloksena (Taulukko 4) saatiin, että α -linoleenihapon pitoisuus kuiva-aineesta vähentyi 100 %, linolihapon 30 % ja eikosaeenihapon 8 %. Sekundaarisessa imeytymispaikassa, paksusuolessa, mikrobien toiminnan seurauksena kasvisolujen seinä hajoaa, jolloin samalla solukalvon rasvahappoja vapautuu ruuansulatuskanavaan. Koska hevosella rasvahapot imeytyvät vain ja ainoastaan primaarisessa imeytymispaikassa eli ohutsuolessa, paksusuolessa vapautuneet solukalvon rasvahapot poistuvat ruuansulatuskanavasta muun ruuansulatusjätteen mukana.⁴⁷ Säilöheinälannan sisältämien tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuudet olivat kasvaneet, palmitiinihapon pitoisuus oli nelinkertainen, steariinihapon 40-kertainen ja arakidiinihapon kolminkertainen. Kuivaheinässä vastaavasti pitoisuudet olivat kaksinkertainen, 34-kertainen ja kolminkertainen.

Tässä tutkielmassa tehty rasvahappojen uutto heksaanilla ei erotellut kaikkia näytteiden sisältämiä rasvahappoja, vain ja ainoastaan vapaat rasvahapot. Elävissä kasvisoluissa rasvahapot pääasiassa esteröityvät muodostaen estereitä. Tällöin niiden poolittomuusaste muuttuu poolisemmaksi ja ne eivät uutu hyvin poolittomalla heksaanilla näytteestä kuten heksaanin kanssa saman poolittomuusasteen vapaat rasvahapot. Tässä työssä käytetyllä menetelmällä (heksaani, Soxhlet -uutto) saatiin analysoitua rehujen sisältämät rasvahapot sekä lantanäytteistä paksusuolen mikrobien vapauttamien rasvahappojen pitoisuus sekä vapaiden rasvahappojen koostumuksen muutos rehu- ja lantanäytteiden välillä. Työssä saatiin korsirehujen sisältämien rasvahappojen kokonaispitoisuuksiksi huomattavasti alhaisemmat pitoisuudet kuin vertailtavissa artikkeleissa^{48,51,55}, joissa kahdessa käytettiin uuttoliuottimena dietyylieetteriä ja yhdessä ei mainittu menetelmästä mitään. Artikkeleissa rasvahappojen kokonaispitoisuuksiksi oli saatu 23 g kg^{-1} ka, 13 g kg^{-1} ka ja $23,5 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Heksaani on poolittomampi kuin dietyylieetteri. Heksaanilla saatava tulos on 96,7 % dietyylieetterillä saadusta tuloksesta. Poolisuuden taso ei selitä kokonaan työn korsirehunäytteiden alhaista rasvahappopitoisuutta. Heksaani on yhtä hyväksytty ja käytetty liuotin rehunäytteiden rasvahappoerottelussa kuin dietyylieetteri. Tässä tutkielmassa käytetty uuttoaika oli

lyhyempi, mikä voi myös vaikuttaa tulokseen. Tässä käytetty uuttoaika oli 4 tuntia, kun artikkelissa⁴⁸ uutettiin 6 tuntia. Lisäksi korsirehujen laji ja kasvuaste vaikuttavat rehun kemialliseen koostumukseen. Kauranäytteen kokonaisrasvahappopitoisuus oli myös huomattavasti alhaisempi kuin vertailukohteena olevissa artikkeleissa,^{34,44,45} joista Zeyner *et al.*³⁴ raportoivat artikkelissaan käyttäneensä liuottimena dietyylieetteriä ja saksalaista kauraa. Zhou *et al.*⁴⁴ vertailivat artikkelissaan useita eri menetelmiä ja käyttäneensä kauraeriä, jotka olivat eri puolilta maapalloa. Heksaani oli yksi uuttoluottimista. Edellä mainituissa artikkeleissa tuloksina saatiin vaihtelevasti kymmeniä grammoja kilogrammassa kuiva-ainetta. Lantanäytteiden sisältämien rasvahappojen pitoisuus oli myös alhaisemmalla tasolla kuin vertailukohteena olevissa artikkeleissa,^{71,72,73} joissa pitoisuuksiksi saatiin 12 – 27 g kg⁻¹ ka, 15 ± 0,1 g kg⁻¹ ka ja 34,7 g kg⁻¹ ka.

Kauranäytteen sisältämä rasvahappojen koostumus ja keskinäisiä pitoisuussuhteita vertailtiin Zhao *et al.*⁴⁴ artikkelissa esitettyjen tulosten kanssa. Rasvahappojen kirjo oli artikkelissa hieman suurempi kuin työstä saaduissa tuloksissa. Artikkelissa oli saatu pitoisuustuloksia myös myristiinihapolle (C14:0) ja palmitiinihapolle (C16:1), joita ei esiintynyt analysoidussa kauranäytteessä. Vastaavasti tämän tutkielman kauranäytteessä havaittiin olevan arakidiinihappoa (C20:0). Tämän tutkielman ja vertailuartikkelin rasvahappojen keskinäisissä pitoisuussuhteissa tyydyttyneiden rasvahappojen pitoisuussuhteet olivat yhtenevät. Tyydyttymättömien ja monitydyttymättömien rasvahappojen suhteet artikkelissa julkaistujen ja työsiossa saatujen tulosten välillä olivat päinvastaiset. Vertailuartikkelissa saatiin α -linoleenihapolle (C18:3) suurin pitoisuus ja öljyhappoa (C18:1) ei esiintynyt kauranäytteessä lainkaan. Kaikki lantanäytteet sisälsivät öljyhappoa.

10.1.4 Liukoisten sokerien pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu

Korsirehujen liukoisten sokerien kokonaismäärä sisälsi glukoosia, galaktoosia, arabinoosia, ksyloosia sekä fruktoosia. Säilöheinän keskimääräiseksi kokonaissokeripitoisuudeksi saatiin 105 g kg⁻¹ ka ja kuivaheinän 117 g kg⁻¹ ka. Lantanäytteet sisälsivät muuten vastaavat hiilihydraattimonomeerit, mutta fruktoosi puuttui. Säilöheinälannan keskimääräiseksi kokonaissokeripitoisuudeksi saatiin 0,93 g kg⁻¹ ka ja kuivaheinälannan 0,76 g kg⁻¹ ka.

Näytteiden sisältämästä sokerista noin puolet oli glukoosia, joka oli myös mielenkiintoisin hiilihydraattimonomeeri, koska se on hyvin keskeinen yhdiste hevosen sokeriaineenvaihdunnassa.⁴⁷ Lisäksi otettiin tarkastelukohteeksi paljon keskustelua herättävä fruktoosi. Taulukossa 5 on esitetty

näytteiden glukoosin ja fruktoosin keskiarvoiset pitoisuudet standardipoikkeamiseen. Rehunäytteet laskettiin kahden rinnakkaisnäytteen keskiarvona ja lantanäytteet kuuden hevosen rinnakkaisnäytteiden keskiarvona.

Taulukko 5. Näytteiden sisältämät glukoosi- ja fruktoosipitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Hiilihydraattimonomeeri	Säilöheinä	Säilöheinälanta	Kuivaheinä	Kuivaheinälanta
Glukoosi	60 ± 20	0,45 ± 0,09	64 ± 4	0,35 ± 0,07
Fruktoosi	2,1 ± 0,7	-	2,58 ± 0,05	-

Kauran sisältämien liukoisten sokerien erottamiseen käytettiin samaa menetelmää kuin korsirehuille. Tuloksia tarkasteltaessa huomattiin, että näytteiden analyysi ei ollut onnistunut. Sillä kirjastosta saadut tulkintaehdotukset olivat aivan muuta kuin mitä odotettiin.

Hiilihydraatit ovat hevosen tärkein energialähde. Liukoisista hiilihydraateista (sokerit) hevonen saa energiaa nopeasti, sillä niiden pilkkominen alkaa jo ruuansulatuskanavan alussa ja imeytyminen tapahtuu hevosen ohutsuoletta.⁴⁷ Säilöheinän yksittäisten rinnakkaisnäytteiden kokonaispitoisuudet poikkesivat keskenään 35 %, joka oli suuri ero. Se oli huomattavastikin suurempi kuin kuivaheinän rinnakkaisnäytteillä. Kuivaheinän rinnakkaisnäytteiden pitoisuuksilla oli eroa vain 3 %. Glukoosipitoisuuksien tulokset (Taulukko 5) olivat säilöheinälle (60 ± 20 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälle (64 ± 4 g kg⁻¹ ka). Fruktoosipitoisuuksien tulokset olivat säilöheinälle (2,1 ± 0,7 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälle (2,58 ± 0,05 g kg⁻¹ ka). Lisäksi korsirehunäytteistä saatiin analysoitua 67 % etanoli-veesi uutolla galaktoosi, arabinoosi ja ksyloosi hiilihydraattimomomeereja, jotka ovat soluseinän hemiselluloosaosan rakennehiilihydraatteja ja joita esiintyy myös vapaana. Glukoosin pitoisuus koko liukoisten sokerien pitoisuudesta oli molemmissa korsirehuissa hieman yli puolet. Säilöheinässä suhde oli 52 % ja kuivaheinässä 54 % (Taulukko 5).

Tässä tutkielmassa käytettyjen lantanäytteiden sisältämien liukoisten sokerien pitoisuudet olivat samalla tasolla keskenään. Mikä osittaa, että tutkielmassa käytettyjen rehujen säilöntämenetelmällä ei ollut merkitystä hevoselle sokerien hyödyntämisen kannalta. Lantanäytteiden kokonaissokeripitoisuudet sisälsivät glukoosia (Taulukko 5), jota oli säilöheinälannassa (0,45 ± 0,09 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälannassa (0,35 ± 0,07 g kg⁻¹ ka). Kummankin lantaerän sisältämän glukoosin pitoisuus oli hieman alle puolet, kun vertailtiin glukoosipitoisuuksia

lantänäytteiden kokonaissokeripitoisuuksiin. Säilöheinälannassa suhde oli 48 % ja kuivaheinälannassa 46 %.

Lantanäytteiden liukoisten sokerien kokonaispitoisuudet olivat huomattavasti alhaisemmat kuin korsirehujen pitoisuudet. Kummankin dieetin keskimääräinen kokonaispitoisuus oli romahtanut sadasosaan, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi. Tuloksista huomattiin myös, että korsirehuissa havaittua fruktoosia ei havaittu enää kummankaan dieetin lantanäytteissä (Taulukko 5). Lisäksi huomattiin, että glukoosin osuus kokonaissokeripitoisuudesta oli laskenut reilusta 50 prosentista alle 50 prosenttiin. Koska säilöheinästä uutettujen rinnakkaisnäytteiden hajonta oli suuri, se vaikeutti näyte-erien sisältämien sokeri- ja glukoosipitoisuuksien sekä niiden imeytymisen suhteiden tulkitsemista keskenään. Tutkielman tulosten perusteella näyttäisi siltä, että näytteiden sisältämien liukoisten hiilihydraattien hyödyntämisessä on eroa. Kuivaheinän ja kuivaheinälannan välillä kokonaissokeripitoisuuksien hävikki oli suurempi kuin säilöheinän ja säilöheinälannan välillä. Sama ilmiö havaittiin tärkeimmällä hiilihydraattimonomeerillä glukoosilla. Hiilihydraattimonomeeri arabinoosin pitoisuus vaihteli eri hevosten välillä, eikä sitä havaittu kaikkien hevosten lantanäytteissä lainkaan. Lisäksi lantaerien välillä oli eroja.

Liukoisten sokerien kokonaishyödyntämisessä ei havaittu tammojen ja ruunien välillä sukupuolijakaumaa, kuten ei myöskään glukoosin hyödyntämisessä (Taulukko 5). Pitoisuuksien vaihtelu eri hevosten välillä oli satunnaista. Säilöheinälantanäytteiden liukoisten hiilihydraattien suurimman ja pienimmän pitoisuuden välillä oli eroa 32 % ja kuivaheinälannassa 28 %. Säilöheinälannan suurin kokonaissokeripitoisuus oli 1,1 g kg⁻¹ ka ja pienin 0,75 g kg⁻¹ ka. Vastaavasti kuivaheinälannassa oli 0,93 g kg⁻¹ ka ja 0,67 g kg⁻¹ ka. Säilöheinälannoista suurin liukoisten sokerien pitoisuus oli hevosella numero 6 ja pienin numerolla 3. Vastaavasti kuivaheinälannassa suurin pitoisuus oli hevosella 4 ja pienin hevosella 1. Säilöheinälannan suurin glukoosipitoisuus oli 0,56 g kg⁻¹ ka ja pienin 0,35 g kg⁻¹ ka. Vastaavasti kuivaheinälannassa oli 0,43 g kg⁻¹ ka ja 0,30 g kg⁻¹ ka. Säilöheinälantojen hevokohtaisissa pitoisuuksissa oli huomattavastikin suurempaa vaihtelua kuin kuivaheinälannoissa. Kuivaheinälannan pienin pitoisuus ei ollut hevosella 1 kuten säilöheinälannoissa, vaan se oli hevosella numero 6. Hevosten 1 ja 6 lantojen glukoosipitoisuudet olivat erittäin lähellä toisiaan, eroa oli vain 0,002 g kg⁻¹ ka. Tuloksista huomattiin, että hevonen, jonka lanta sisälsi suhteessa paljon sokereita, sisälsi myös paljon glukoosia. Vastaava havainto tehtiin myös pitoisuuden vähyyden kanssa.

Tässä tutkielmassa käytetyistä timotei-heinänäytteistä saatujen liukoisten sokerien pitoisuudet olivat hieman alhaisemmat kuin vertailukohtena olevissa artikkeleissa^{74,75}. Ordakowski-Burk *et al.*⁷⁴

kirjoittivat artikkelissaan saaneensa NSC-pitoisuudeksi 131 g kg^{-1} ka, ja Watts⁷⁵ artikkelissaan $132,6 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Seinäjoen elintarvike- ja ympäristölaboratorio suosittelee sivuillaan korsirehuanalyysiohjeissaan liukoisten sokerien pitoisuudeksi $50 - 150 \text{ g kg}^{-1}$ ka.⁵³ työn korsirehujen liukoisten sokerien pitoisuudet olivat erittäin hyvällä tasolla. Glukoosin ja fruktoosin yhteispitoisuus työn korsirehuissa oli keskimäärin alhaisemmalla tasolla kuin vertailtavassa Palmgren Karlssonin *et al*⁷⁶. artikkelissa, jossa glukoosin ja fruktoosin yhteispitoisuudeksi oli saatu 96 g kg^{-1} ka. Analysoidut fruktoosipitoisuudet olivat käsittääkseni liian alhaiset molemmissa korsirehunäytteissä. 67 % etanoli-vesi seos ei ollut todennäköisesti riittävä erottamaan kaikkia fruktaaneja korsirehunäytteistä, vaan tarvittaisiin 80 % etanoli-vesi seos.

10.2 Happohydrolyysillä erotellut fraktiot

Happohydrolyysiä varten näytteet punnittiin heksaanilla uutetuista ja ilmakeivatuista näytteistä. Samoista näytteistä määritettiin myös kuiva-aineen massa pitoisuuslaskuja varten. Poikkeuksellisesti kauranäytteet punnittiin alkuperäisestä ilmakeivatuista näytteestä. Näytteitä punnittiin mahdollisimman tarkasti $0,250 \text{ g}$. Ne happohydrolysoitiin koeputkissa 72 % rikkihapolla (H_2SO_4), lisäämällä hitaasti happoa näytteeseen 4 ml . Putkia pidettiin $31 \text{ }^\circ\text{C}$ lämpöhauteessa 1 h ajan, useamman kerran sekoittaen (Kuva 13).



Kuva 13. Happohydrolyysi käynnissä koeputkissa $31 \text{ }^\circ\text{C}$ vesihauteessa.

Happohydrolyysin jälkeen näytteet huuhdeltiin tarkasti 250 ml säilöpulloihin käyttämällä 112 ml UHQ-vettä. Näytteet suljettiin tarkoin ja siirrettiin autoklaavilaitteeseen. Ohjelmana käytettiin 1 bar painetta 30 minuutin ajan. Jäähdytyksen jälkeen näytteet suodatettiin taarattujen ja punnittujen sintterien läpi käyttäen Wulffin pulloa ja imulaitetta. Huolellinen huuhtelu tehtiin kuumalla UHQ-vedellä. Sinttereihin suodattunut saostuma otettiin talteen, joka oli pääasiassa liukenematonta ligniiniä. Suodokset siirrettiin 500 ml mittapulloihin ja täytettiin mittatilavuuteen UHQ-vedellä.

Suodoksesta mitattiin 10 ml dekanterilasiin. Näytesuodoksille tehtiin ioninvaihto. Vaihtoon käytettiin regeneroitua IRA 68 anioninvaihtohartsia, jonka natriumkarbonaattipitoisuus (Na_2CO_3) oli 1 M. Kun pH saavutti arvon 4, näyte suodatettiin välittömästi käyttäen Wulffin pulloa ja imulaitetta. Suodos siirrettiin pyörökolviin. Hartsin ja imupullon huuhteluun käytettiin UHQ-vettä yhteensä 40 ml. Vesi haihdutettiin kuiviin pyöröhaihduttimella (Kuva 14).

Monosakkaridipitoisuuden määrittämiseksi valmistettiin standardiliuokset (STD) I ja II. STD I varten mitattiin 19 ml 4 % rikkihappoa 100 ml dekanterilasiin. Lasiin mitattiin automaattipipetillä 500 μl aiemmin tehtyä hiilihydraattimonomeeristandardiliuosta, joka sisälsi arabinoosia, galaktoosia, glukoosia, ksyloosia ja mannoosia. Kaikkien monomeerien pitoisuudet olivat 0,5 mg ml⁻¹. Liuokselle tehtiin ioninvaihto sekä veden haihdutus kuiviin kuten edellä näytteille. STD II sisälsi vain 500 μl hiilihydraattimonomeeristandardiliuoksen.



Kuva 14. Pyöröhaihduttimet tiivistämässä vesipohjaisia näytteitä.

10.2.1 Liukenemattoman ligniinin analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu

Kun autoklaavissa käytetyt liuokset suodatettiin Wolfin pullon ja imun avulla sintterien läpi, oli rikkihappoon liukenematon ligniini Klason-ligniini (TAPPI T222 om-88) suodattunut sinttereihin (Kuva 15). Sintterit näytteineen kuivattiin lämpökaapissa 108 °C lämpötilassa, jäädytettiin ja punnittiin. Happoon liukenemattoman ligniinin pitoisuus näytteissä saatiin laskemalla punnitustuloksista (Liite 3).



Kuva 15. Hapoon liukenemattomat ligniininäytteet sinttereissä.

Sinttereihin suodattunut Klason-ligniini sisälsi myös jonkin verran epäorgaanista ainesta, Se vähennettiin näytteen massasta, jonka tuloksena saatiin ligniinin pitoisuus. Rehunäytteiden keskiarvoiset ligniinipitoisuudet standardipoikkeamiseen on esitetty taulukossa 6. Kaikkia rehunäytteitä analysoitiin 2 rinnakkaisnäytettä ja lantanäytteitä 6 kappaletta, eri hevositysilöiden näytteet.

Taulukko 6. Näytteiden liukenemattoman ligniininpitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Näyte	Liukenematon ligniini
Säilöheinä	162 ± 2
Säilöheinälanta	200 ± 60
Kuivaheinä	172 ± 13
Kuivaheinälanta	225 ± 6
Kaura	120 ± 40

Kasviravinnon kuitu muodostuu selluloosista ja ligniinistä. Kun kuiturakenteen valmistusprosessi on edennyt kemiallisesti tarpeeksi pitkälle, osa sen sisältämistä yhdisteistä ei hajoa happoon. Kiinteään näytteen sisältämä liukenematon ligniini ei hajoa, kun näytettä hydrolysoidaan hapolla, vaan jää kiinteään olomuotoon. Happoon liukenemattoman ligniinin keskiarvoiset pitoisuudet (Taulukko 6) korsirehunäytteissä olivat samalla tasolla keskenään. Säilöheinän liukenemattoman ligniinin pitoisuus oli (162 ± 2 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinän (172 ± 13 g kg⁻¹ ka). Kuivaheinän rinnakkaisnäytteiden standardipoikkeama 13 g kg⁻¹ ka oli reilu kymmenkertainen säilöheinänäytteiden standardipoikkeamaan 2 g kg⁻¹ ka nähden. Kauran sisältämän liukenemattoman ligniinin pitoisuudeksi saatiin (120 ± 40 g kg⁻¹ ka). Kauranäytteen toisen rinnakkaisnäytteen pitoisuus oli epäilyttävän pieni, sillä suurempi pitoisuus oli puolitoistakertainen pienempään pitoisuuteen nähden. Rinnakkaisnäytteiden standardipoikkeama oli suuri. Liukenemattoman ligniinin rinnakkaisnäytteiden värit näytteiden kuivatuksen jälkeen olivat ruskean erisävyiset. Tulosten määrittämisessä oli vain kaksi rinnakkaisnäytettä, minkä takia ei voitu tehdä Grubbs'in testiä epäilyttävälle tulokselle. Yhden rinnakkaisnäytteen tulos ei olisi ollut riittävän pätevä arvioon.

Lantanäytteiden sisältämän liukenemattoman ligniinin keskiarvoiset pitoisuudet olivat suurempia kuin rehujen pitoisuudet. Eri dieettien lantanäytteiden sisältämän liukenemattoman ligniinin (Taulukko 6) keskiarvoiset pitoisuudet olivat hieman poikkeavat toisistaan. Säilöheinälannan pitoisuus oli (200 ± 60 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälannan (225 ± 6 g kg⁻¹ ka). Säilöheinälantojen standardipoikkeama oli kymmenkertainen kuivaheinälannan rinnakkaisnäytteiden standardipoikkeamaan nähden. Säilöheinälannoista hevosen numero 3 liukenemattoman ligniinin pitoisuus poikkesi huomattavasti muista näytteistä. Lisäksi hevosen numero 5 lannan liukenemattoman ligniinin pitoisuus oli epäilyttävän alhainen. Nämä kaksi näytettä laskivat säilöheinälannan keskiarvoista pitoisuutta kohtuullisen paljon. Hevosen numero 3 lantanäytteen liukenemattoman ligniinin pitoisuus oli 94 g kg⁻¹ ka ja hevosen numero 5 näytteestä saatiin tulokseksi 168 g kg⁻¹ ka. Näytteelle hevosen numero 3 säilöheinälannan liukenemattoman ligniinin

pitoisuudelle tehtiin Grubbs'in testi kaava (5) poissulkemisen tueksi. Tulokseksi saatiin, ettei eniten poikkeava pitoisuus ollut hylättävän poikkeava. $P = 0,05$ raja oli 1,887 ja tulokseksi saatiin 1,812, joka oli pienempi kuin taulukkoarvo (Taulukko 1). Näin ollen kuuden näytteen yhteiskeskisarvo jäi voimaan.

Kuivaheinälantanäytteet olivat kaikki keskenään samaa pitoisuusluokkaa. Säilöheinälantanäytteiden happoon liukenemattoman ligniinin pitoisuuksissa suurimman ja pienimmän pitoisuuden ero oli 60 %. Suurin pitoisuus oli hevosella numero 2 ja pienin hevosella numero 3. Suurin pitoisuus oli 239 g kg^{-1} ka. Vastaavasti kuivaheinälannoissa pienin pitoisuus oli hevosella numero 1 ja suurin hevosella numero 2. Pienin pitoisuus oli 217 g kg^{-1} ka ja suurin 232 g kg^{-1} ka. Kummassakaan lantanäyte-erässä ei havaittu tammojen ja ruunien sukupuolijakaumaa. Pitoisuuksien vaihtelu eri hevosten välillä oli satunnaista. Lantanäytteet sisälsivät myös kokokauran sisältämän liukenemattoman ligniinin.

Kirjallisuudessa,^{19,29,48,49,51} joihin verrattiin näytteiden kuituaineksen eri komponenttien pitoisuuksia, ei esitetty lainkaan liukenemattoman ligniinin pitoisuuksia. Pitoisuudet oli sisällytetty muun muassa NDF-pitoisuuteen. Artikkeleissa^{19,29,48,49,51} esitettiin monia muita kuituosaa kuvaavia tuloksia.

10.2.2 ADL:n analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu

Happohydrolyysistä saatu suodos sisälsi liukenevan ligniinin. ADL-pitoisuus määritettiin laimennetuista suodoksista UV-VIS-tekniikalla.. Näytteistä saadut raa'at suodokset olivat liian väkeviä, sillä niiden absorbanssit (A) eivät sijoittuneet toivotulle alueelle 0,3 – 0,8, vaan olivat suurempia. Säilöheinäsuodoksia laimennettiin 1/4, kuivaheinäsuodoksia 9/20, kaurasuodoksia 1/5 sekä säilöheinälantasuodoksia 2/5 ja kuivaheinälantasuodoksia 7/20. Laimennos tehtiin 4 % rikkihapolla. Mittausajankohta oli lähempänä 24 tuntia kuin 6 tuntia autoklaavityöosiosta. Analysoinnin suorituksen suositus oli alle 6 tuntia, mutta 24 tunnin sisällä olivat käyttökelpoisia.

Näytteiden keskiarvoiset ADL-pitoisuudet standardipoikkeamiseen (Liite 3) on esitetty taulukossa 7. Kaikkia rehunäytteitä analysoitiin 2 rinnakkaisnäytettä ja lantanäytteitä 6 rinnakkaisnäytettä.

Taulukko 7. Näytteiden sisältämän ADL-pitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Näyte	ADL-pitoisuus
Säilöheinä	32,9 ± 1,4
Säilöheinälanta	25,1 ± 1,2
Kuivaheinä	24 ± 4
Kuivaheinälanta	23 ± 3
Kaura	30 ± 20

Happoon liuennut ligniini on ligniinin kokonaismäärästä se osa, joka ei ole liukenemattomassa lignoselluloosassa. ADL-fraktio kuuluu osana sekä NDF- että ADF-pitoisuuksia. Korsirehujen sekä kokojyväkauran sisältämät ADL-pitoisuudet (Taulukko 7) olivat melko samalla tasolla keskenään, säilöheinän pitoisuus oli (32,9 ± 1,4 g kg⁻¹ ka) ja kauran (30 ± 20 g kg⁻¹ ka). Kuivaheinän ADL-pitoisuus oli hieman alhaisempi kuin säilöheinän ja kauran. Kuivaheinän ADL-pitoisuus oli (24 ± g kg⁻¹ ka).

Lantanäytteiden ADL-pitoisuudet (taulukko 7) olivat keskenään samalla tasolla. Säilöheinälannan ADL-pitoisuus oli (25,1 ± 1,2 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälannan (23 ± 3 g kg⁻¹ ka). Näytteiden standardipoikkeamat ovat pienet, mikä kuvastaa rinnakkaisnäytteiden tulosten tiivistä sijoittumista keskiarvojen ympärille.

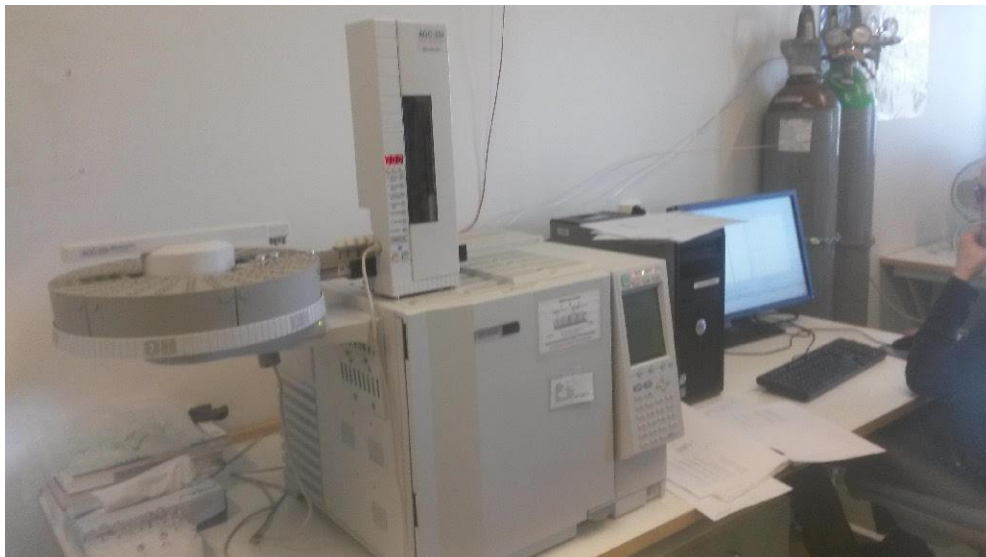
Rehunäytteiden ja lantanäytteiden sisältämien ADL-pitoisuuksien välillä huomattiin pieni laskeva ero, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi. Säilöheinäaterian ADL-pitoisuus oli laskenut hieman enemmän kuin kuivaheinäateriassa. Säilöheinäaterian ADL-pitoisuus oli pienentynyt lähes 8 g kg⁻¹ ka ja kuivaheinäaterian noin 1 g kg⁻¹ ka. Säilöheinälantanäytteistä pienin ADL-pitoisuus oli hevosen numero 1 lantanäytteessä joka oli 23,6 g kg⁻¹ ka. Vastaavasti suurin pitoisuus oli hevosella numero 5, joka oli 26,9 g kg⁻¹ ka. Kuivaheinälantojen pienin pitoisuus oli hevosella numero 6, joka oli 20,8 g kg⁻¹ ka ja suurin hevosella numero 3, jonka pitoisuus oli 26,7 g kg⁻¹ ka. Kuivaheinälantojen keskihajonta oli hieman suurempi kuin säilöheinälantojen. Lantanäytteiden sisältämissä ADL-pitoisuuksissa ei havaittu tammojen ja ruuvien välistä jakaumaa. Eri hevosten tulokset olivat hyvin sattuman varaiset.

Kun verrataan tutkielmassa saatuja tuloksia (Taulukko 7) vertailtaviin tutkimuksiin,^{19,29,49,51} joissa on arvioitu erilaisten korsirehujen sisältämiä ADL-pitoisuuksia, huomataan saatujen pitoisuuksien olevan samaa luokkaa. Kolmessa artikkelissa^{19,29,49} oli saatu hieman korkeampia pitoisuuksia ja yhdessä artikkelissa⁵¹ saadut pitoisuudet asettuivat rinnakkaisnäytteiden maksimi- ja minimiarvon väliin. Esimerkkinä korkeammista ADL-pitoisuuksista on Miyaji *et al.*⁴⁹ artikkelissa, jossa arvioitiin pitkälle korsiintuneen timoteiheinän ADL-pitoisuuksien olleen minimissään 27 g kg⁻¹ ka

ja maksimissaan 77 g kg^{-1} ka. Tässä tutkielmassa saaduista tuloksista säilöheinän ADL-pitoisuus sijoittui vertailuväliin, mutta kuivaheinän ei. Tarkoilla vertailuarvoilla ei sinällään ole merkitystä, sillä ligniinin kehitysaste riippuu hyvin paljon siitä, milloin heinä päästään korjaamaan. Suomen kesän sateisuus määrittelee hyvin pitkälti sen milloin on mahdollista niittää heinä. Mitä pidemmälle niitto siirtyy ravitsemuksellisesti parhaimmasta kasvun ajankohdasta (heti kukinnan päätyttyä), sitä enemmän heinä sisältää sekundaarista soluseinää sekä lignoselluloosaa ja ligniiniä. Maantieteellisesti saatujen eri satojen välillä voi olla suuriakin pitoisuuseroja.

10.2.3 Happohydrolyysillä pilkottujen hiilihydraattien analysointi, tulokset sekä tulosanalyysi ja vertailu

Pyörökolveissa 250 ml olevien näytteiden sekä STD I ja STD II sekaan lisättiin sisäiseksi standardiksi 1 ml ksylitolia, jonka pitoisuus oli $0,251 \text{ mg ml}^{-1}$. Kaikki näytteet kuivattiin pyöröhaihduttimella. Kaikkiin näytteisiin sekä STD I ja STD II lisättiin 1 ml kuivaa pyridiiniliuosta sekä 500 μl silylointireagenssia. Seoksia ravisteltiin ravistelulaitteella 40 minuuttia, jonka jälkeen näytteet siirrettiin vialleihin ja analysoitiin (Kuva 16).



Kuva 16. Hiilihydraattimonomeerien määrittäminen kaasukromatografilla.

Rikkihappohydrolyysillä rehujen sisältämien pilkottujen hiilihydraattipolymeerien sisältämiä monomeereja olivat arabinoosi, galaktoosi, glukoosi, mannoosi ja ksyloosi. Kuivaheinänäytteen sisältämä galaktoosipitoisuus oli erittäin alhainen, eikä sen pitoisuutta pystytty mittaamaan. Näytteistä tunnistetut hiilihydraattimonomeerit sekä niiden pitoisuudet on esitetty taulukossa 8. Kaikkia rehunäytteitä analysoitiin 2 rinnakkaisnäytettä. ja lantanäytteitä 6 rinnakkaista näytettä.

Taulukko 8. Happohydrolyysin tuloksena saadut hiilihydraattimonomeerit ja niiden pitoisuudet näytteissä, g kg⁻¹ ka

Hiilihydraattimonomeeri	Säilöheinä	Säilöheinälanta	Kuivaheinä	Kuivaheinälanta	Kaura
Arabinoosi	30	21,7	30	20	20
Galaktoosi	10	1,7	0	0	10
Glukoosi	285	282	325	327	585
Mannoosi	20	3,3	20	1,7	10
Ksyloosi	130	185	140	190	80
YHTEENSÄ	475	498	513	543	706

10.2.3.1 Hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu

Hiilihydraattimonomeerien avulla laskettiin hemiselluloosan ja selluloosan määrät näytteissä. Selluloosa sisältää vain glukoosia. Analysoidusta glukoosin määrästä polymeerirakenteisena on 90 %. Muut hiilihydraattimonomeerit ovat hemiselluloosarakenteen hiilihydraatteja. Arabinoosista polymeerirakenteena esiintyy 88 %, galaktoosista 90 %, mannoosista 90 % ja ksyloosista 88 % (Liite 3). Hemiselluloosan ja selluloosan hiilihydraattipitoisuudet standardipoikkeamiseen on esitetty taulukossa 9.

Taulukko 9. Näytteiden hemiselluloosan ja selluloosan keskiarvoiset pitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Näyte	Hemiselluloosa	Selluloosa
Säilöheinä	168 ± 0	260 ± 20
Säilöheinälanta	185 ± 11	220 ± 20
Kuivaheinä	168 ± 13	293 ± 7
Kuivaheinälanta	186 ± 13	290 ± 20
Kaura	106 ± 0	(32 – 176)*

*käytetty artikkelia 77 arviointipohjana

Hemiselluloosan ja selluloosan sisältämät hiilihydraatit imeytyvät hevosen paksusuolesta, kun mikrobit ovat vapauttaneet hemiselluloosan ja selluloosan polymeerirakenteista erillisiä monomeeriyksiköitä. Tämän osion tuloksia läpikäydessä oli huomioitava mahdollinen karsinan kuivikkeen (turve) tuoma pitoisuuslisä.

Rehunäytteiden happohydrolyysissä vapautuneiden hiilihydraattien kokonaispitoisuuksiksi (Taulukko 8) saatiin säilöheinälle 475 g kg^{-1} ka, kuivaheinälle 513 g kg^{-1} ka sekä kauralle 706 g kg^{-1} ka. Säilöheinä sisälsi kaikkia hemiselluloosaa rakentavia hiilihydraattimonomeereja sekä selluloosassa olevaa glukoosia. Kuivaheinän hemiselluloosan galaktoosipitoisuus oli niin alhainen, että sen pitoisuutta ei pystytty määrittämään. Kummankin korsirehun hemiselluloosan sisältämistä hiilihydraattimonomeereistä korkein pitoisuus oli ksyloosilla. Analyysissä saatiin korkein monomeeripitoisuus glukoosille. Korsirehujen hemiselluloosan pitoisuudeksi (Taulukko 9) säilöheinässä saatiin $(168 \pm 0 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$ ja kuivaheinässä $(168 \pm 13 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$. Kuivaheinätuloksen standardipoikkeama oli suurempi kuin säilöheinätuloksen. Korsirehujen sisältämät selluloosapitoisuudet poikkesivat hieman toisistaan. Säilöheinässä arvioitiin olevan selluloosaa $(260 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$ ja kuivaheinässä $(293 \pm 7 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$. Säilöheinän standardipoikkeama oli yli kolminkertainen suhteessa kuivaheinän standardipoikkeamaan.

Tässä tutkielmassa analysoitu kaura (Taulukko 9) sisälsi hemiselluloosaa $(106 \pm 0 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$. Kauran sisältämä glukoosipitoisuus määritettiin kokonaisuutena, se sisälsi sekä tärkkelyksen että selluloosan sisältämän glukoosin. Tulokset käsiteltiin poikkeavasti vertailemalla Lásztityn⁷⁷ artikkelissa esitettyihin tuloksiin. Kauran sisältämän selluloosapitoisuuden arvioitiin olevan välillä $(32 - 176 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka})$. Pitoisuus laskettiin $39 - 55 \%$ tärkkelyspitoisuuteen perustuen. Lopusta glukoosista osa oli selluloosaa ja pieni osa vapaina monomeereina.

Lantanäytteiden happohydrolyysillä vapautuneiden hiilihydraattimonomeerien kokonaispitoisuudet (Taulukko 8) olivat säilöheinälannassa 498 g kg^{-1} ka ja kuivaheinälannassa 543 g kg^{-1} ka. Lantanäytteiden sisältämät hiilihydraattimonomeerit olivat vastaavat kuin korsirehuissa. Säilöheinälanta sisälsi kaikkia etukäteen arvioituja monomeereja, mutta kuten kuivaheinän galaktoosipitoisuutta, sitä ei myöskään havaittu kuivaheinälannassa. Ruokamassa sisälsi kauran sisältämän galaktoosin, jonka vähäinen pitoisuus pieni entuudestaan, kun ruokamassa kulkeutui ruuansulatuskanavan läpi. Koska kauramäärä koko ruokamäärästä oli vain pieni osa (10 %), sekin vähäinen galaktoosipitoisuus pieni entuudestaan kuten säilöheinäaterian prosessista voitiin havaita. Kun vertailtiin rehujen sisältämiä hiilihydraattimonomeeripitoisuuksia lantanäytteiden monomeeripitoisuuksiin, huomattiin arabinoosin, galaktoosin ja mannoosin pitoisuuksien selkeästi

vähenevä trendi. Lisäksi huomattiin glukoosin pitoisuuden pysyneen lähes samana ja ksyloosin kasvaneen. Tuloksista voitiin päätellä, että hevonen käyttää toisia hiilihydraattimonomeereja paremmin hyödykseen kuin toisia. Ksyloosin pitoisuuden kasvu kuvastaa, ettei sitä käytetä hyväksi. Glukoosin saman tason pitoisuus sekä korsirehujen että lantanäytteiden välillä kuvastaa, että rakenteissa olevaa glukoosia ei käytetty hyväksi juurikaan tai lainkaan. Kauran sisältämä tärkkelys ja rakenteellinen glukoosi kohottivat reilusti ruokamassan glukoosipitoisuutta, mikä väheni massan edetessä ruuansulatuskanavassa. Säilöheinälantanäytteiden hemiselluloosan (Taulukko 9) pitoisuus oli ($185 \pm 11 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja kuivaheinälantanäytteiden ($186 \pm 13 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$). Säilöheinälantaerien pitoisuudet olivat hyvin samalla tasolla keskenään. Niiden keskivirheetkin olivat toistensa kaltaiset. Säilöheinälannan selluloosan pitoisuus oli ($250 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$) ja kuivaheinälannan ($290 \pm 20 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$). Säilöheinä- ja kuivaheinälantojen selluloosapitoisuudet poikkesivat keskenään. Rinnakkaisnäytteiden standardipoikkeamat olivat kuitenkin keskenään kohtuullisesti samalla tasolla. Tämä kuvastaa kummankin näyte-erän rinnakkaisnäytteiden tiivistä ryhmittymistä keskiarvon ympärille. Kun vertailtiin hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuuksia rehu- ja lantanäytteiden kesken huomattiin yhteneviä piirteitä tuloksissa. Korsirehunäytteiden ja lantanäytteiden tulokset olivat samalla tasolla pareittain. Ilmiö antoi ymmärtää, että työ oli onnistunut tältä osin.

Lantanäyte-erien sisältämien hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuusarvioissa ei havaittu tammojen ja ruunien sukupuolijakaumaa. Tulokset vaihtelivat epäsäännöllisesti. Säilöheinälannan hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuuksissa useammassa näytteessä havaittiin sama pitoisuus. Hemiselluloosan pienin pitoisuus $176 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ havaittiin hevosilla numerot 3, 5 ja 6 ja suurin pitoisuus $202 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ hevosella numero 1. Selluloosaa oli eniten hevosten numerot 1 ja 4 lantanäytteissä ja pienin pitoisuus oli hevosella numero 2. Suurin pitoisuus oli $279 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$ ja pienin $225 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$. Vastaavasti kuivaheinälantojen suurin hemiselluloosapitoisuus oli hevosen numero 1 lantanäytteessä, joka oli $202 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$, ja pienin pitoisuus oli hevosella numero 2. Sen pitoisuus oli $167 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$. Selluloosaa havaittiin eniten hevosen numero 6 lantanäytteessä. Sen pitoisuus oli $315 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$. Pienin pitoisuus oli hevosella numero 3, jonka pitoisuus oli $270 \text{ g kg}^{-1} \text{ ka}$.

Kun vertailtiin korsirehuista saatuja tuloksia (Taulukko 9) vertailtaviin artikkeleihin^{48,49}, joissa oli esitetty työssä saatujen hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuudet, huomattiin tämän tutkielman tulosten sijoittuvan Jančík *et al.*⁴⁸ artikkelin vertailutulosten ääriarvojen väliin ja Miyaji *et al.*⁴⁹ pitoisuustulosten alapuolelle. Vertalutulokset olivat viiden eri heinälajin sisältämän kuituaineen pitoisuuksia, kun heinät niitettiin eri kasvuasteilla.⁴⁸ Nämä tukevat saatujen tulosten oikeellisuutta.

Vertailutuloksissa oli saatu hemiselluloosan minimipitoisuudeksi 145 g kg^{-1} ka ja maksimipitoisuudeksi 308 g kg^{-1} ka. Vastaavasti selluloosan pitoisuuksiksi oli saatu 169 g kg^{-1} ka ja 351 g kg^{-1} ka. Woodward *et al.*²⁹ saivat työssään hemiselluloosapitoisuudet välille $223 - 250 \text{ g kg}^{-1}$ ka ja selluloosan $319 - 360 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Molemmat pitoisuusvälit olivat korkeammat kuin tässä tutkielmassa saadut tulokset. Tässä tutkielmassa saatuja kauran sisältämien hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuuksia verrattiin Woodward *et al.*²⁹ artikkelin tuloksiin. Woodward *et al.*²⁹ saivat työssään kauran hemiselluloosan pitoisuudeksi 236 g kg^{-1} ka, joka oli yli kaksinkertainen pitoisuus tässä tutkielmassa saatuun tulokseen nähden. Tässä tutkielmassa analysoidun kauranäytteen sisältämä kokonaishiilihydraattipitoisuus (Taulukko 8) oli hieman alhaisempi kuin Lásztityn⁷⁷ esittämä pitoisuusväli., joka oli $750 - 800 \text{ g kg}^{-1}$ ka, mutta artikkelissa tehdyssä kokokauran kemiallisessa analyysissä saatiin edellä esitettyä kokonaispitoisuutta alhaisempi saanto. Eri kauratyypin saannot olivat välillä $530 - 658 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Tässä tutkielmassa saatu tulos asettui vertailuartikkelissa esitettyjen teoreettisten ja analysoitujen pitoisuuksien väliin, minkä perusteella saanto tuntui realistiselta. Tärkkelyksen osuudeksi ruotsalaisessa kokojyväkaurassa oli saatu $39 - 55 \%$ kuiva-aineesta.⁷⁷ Tämän perusteella voitiin arvioida tässä tutkielmassa saatujen selluloosan (Taulukko 9) ja tärkkelyksen osuus kuiva-aineesta. Arvio oli suuntaa antava. Jos näyte sisälsi tärkkelystä 39% , sisälsi se selluloosaa keskiarvoisesti (2 rinnakkaisnäytettä) $175,5 \text{ g kg}^{-1}$ ka ja vastaavasti, jos tärkkelystä oli 55% , niin selluloosaa oli $31,5 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Pitoisuusväli on suuri. Kauran sisältämästä glukoosista, jota oli 585 g kg^{-1} ka, tärkkelystä oli $390 - 550 \text{ g kg}^{-1}$ ka. Vertailuartikkeleissa^{34,76} oli yleisesti saatu tärkkelyspitoisuuksiksi reilut 400 g kg^{-1} ka. Kun verrataan tuloksia keskenään, huomataan pitoisuuksien olevan samalla tasolla.

Lantanäytteiden sisältämän hemiselluloosan ja selluloosan pitoisuuksia ei esitetty vertailtavissa artikkeleissa^{71,72,73}. Vertailtavat artikkelit sisälsivät kuitupitoisuuteen liittyvää tietoa, mutta hemiselluloosa ja selluloosapitoisuudet oli sisällytetty sulamattoman sekä happoon liukenevan kuidun parametreihin. Vertailtavat artikkelit käsitelivät lannan jatkokäsittelyä.

10.2.3.2 NDF- ja ADF-pitoisuudet näytteissä sekä tulosanalyysi ja vertailu

Kun arvioidaan kasviaineksen ravitsevuutta ja sulavuutta, ilmoitetaan usein ominaisuuteen vaikuttavien kasviainekomponenttien yhteispitoisuus. Pitoisuudet laskettiin tiettyjen komponenttien summana (Liite 3). NDF- sekä ADF-pitoisuudet eri näytteissä on esitetty taulukossa 10.

Taulukko 10. Näytteiden NDF ja ADF keskiarvoiset pitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka

Kuitu	Säilöheinä	Säilöheinälanta	Kuivaheinä	Kuivaheinälanta	Kaura
NDF	619	661	657	746	(292 – 436)*
ADF	451	477	489	546	(186 – 330)*

* käytetty artikkelia 77 arviointipohjana

Tarkasteltaessa tuloksia (Taulukko 10), huomattiin, että säilöheinän sisältämä NDF-pitoisuus oli alhaisempi kuin kuivaheinän. Säilöheinän NDF-pitoisuus oli 619 g kg⁻¹ ka ja kuivaheinän 657 g kg⁻¹ ka. Lantanäyte-erien välillä nähtiin samanlainen keskinäinen suhde. Säilöheinälannan keskiarvoinen NDF-pitoisuus oli 661 g kg⁻¹ ka ja kuivaheinälannan 746 g kg⁻¹ ka. Vastaava suhde näkyi myös ADF-pitoisuuksissa. Säilöheinän ADF-pitoisuus oli 451 g kg⁻¹ ka, kuivaheinän 489 g kg⁻¹ ka ja säilöheinälannan 477 g kg⁻¹ ka sekä 546 g kg⁻¹ ka. Kuivaheinän sisältämät suuremmat selluloosan (Taulukko 9) ja liukenemattoman ligniinin (Taulukko 6) pitoisuudet kasvattivat sekä NDF- että ADF-pitoisuutta sekä rehunäytteissä että lantanäytteissä. Kumpikin parametri sisältää selluloosa- ja liukenemattoman ligniinin osan, mutta ei sisällä hemiselluloosaa, mikä erottaa NDF- ja ADF-parametrit toisistaan.

Kun vertailtiin saatuja NDF-pitoisuuksia vertailtavien artikkelien^{19,29,48,49} tuloksiin havaittiin, että tulokset olivat pääosin yhtenevät. Työssä saadut tulokset olivat vertailtavien artikkelien^{19,48} maksimi- ja minimipitoisuuksien välillä. Maksimi- ja minimivälit olivat (495 – 737 g kg⁻¹ ka)¹⁹ ja (337 – 691 g kg⁻¹ ka)⁴⁸. Pitkälle korsiintuneiden hakettujen ja jauhettujen timoteiheinän NDF-pitoisuudeksi oli saatu 721 g kg⁻¹ ka ja 715 g kg⁻¹ ka.¹⁹ Tässä tutkielmassa saadut tulokset olivat edellä mainittuja pitoisuuksia selkeästi pienemmät. Woodward *et al.*²⁹ esitti artikkelissaan korsirehun sisältävän NDF-kuitua 615 – 637 g kg⁻¹ ka. Tässä tutkielmassa määritetyn kuivaheinän NDF-pitoisuus oli edellä esitettyä haarukkaa hieman suurempi. Vastaavasti vertailtaessa saatuja ADF-pitoisuuksia vertailuartikkeleissa^{19,29,48,49} esitettyihin tuloksiin, huomattiin saatujen tulosten asettuvan esitettyjen maksimi- ja minimiarvojen väliin tai ihan sen tuntumaan. Martin-Rosset *et al.*¹⁹ artikkelissa, jossa pitoisuusväli oli 255 – 447 g kg⁻¹ ka, näyteotos oli huomattavan laaja (60 näytettä) verrattuna muihin tutkimuksiin. Vertailuartikkeleissa^{19,29,48} esitetty ADF-pitoisuudet olivat pienemmät kuin työssä saadut pitoisuudet, vertailupitoisuudet olivat 319 – 360 g kg⁻¹ ka (yksi heinäerä, jota syötettiin useamman ruokinnan ajan) ja 409 sekä 417 g kg⁻¹ ka.

Tässä tutkielmassa analysoidun kauran (Taulukko 10) sisältämää NDF-pitoisuusväliä vertailtiin vertailtavien artikkelien^{29,34,76} tuloksiin ja huomattiin, että vain Palmgren Karlsson *et al.*⁷⁶ artikkeli oli tässä tutkielmassa saadun pitoisuusvälin kanssa samoilla linjoilla. Woodward *et al.*²⁹ ja Zeyner

*et al.*³⁴ tulokset olivat enemmän tai vähemmän suurempia. Pitoisuudet olivat artikkelien viitenumeroiden kronologisessa järjestyksessä 342 g kg⁻¹ ka, 618 g kg⁻¹ ka ja 268 g kg⁻¹ ka, joista 618 g kg⁻¹ ka oli epäilyttävän suuri. Tässä tutkielmassa analysoidun kauranäytteen ADF-pitoisuusväli oli Zeyner *et al.*³⁴ artikkelin kanssa samoilla linjoilla, Woodward *et al.*²⁹ ja Palmgren Karlsson *et al.*⁷⁶ artikkelit poikkesivat jonkin verran tämän tutkielman arvioidusta pitoisuusalueesta. Vertailupitoisuudet olivat 192 g kg⁻¹ ka, 382 g kg⁻¹ ka ja 128 g kg⁻¹ ka.

Tässä tutkielmassa analysoitujen lantanäytteiden sisältämiä NDF-pitoisuuksia vertailtiin vertailuartikkeleissa^{71,72} esitettyihin pitoisuuksiin. Tässä tutkielmassa saatu säilöheinälannan NDF-pitoisuus (Taulukko 10) oli pienempi kuin kummassakaan vertailuartikkelissa esitetty tulos. Kahden lantanäytteen (3 ja 5) heikko saanto alensi keskiarvoista NDF-pitoisuutta selkeästi. Pitoisuusero Mönch-Tegeder *et al.*⁷¹ esittämään alhaisimpaan tulokseen oli muutaman prosentin verran, mutta Mönch-Tegeder *et al.*⁷² kirjoittamassa artikkelissa esitettyyn NDF-analyysipitoisuuteen 12 %. Kuivaheinälannasta analysoitu keskiarvoinen NDF-pitoisuus oli Mönch-Tegeder *et al.*⁷¹ esittämän NDF-pitoisuushaarukan 708 – 799 g kg⁻¹ ka alueella, mutta pienempi kuin Mönch-Tegeder *et al.*⁷² kirjoittamassa artikkelissa tulos (750 ± 1,9 g kg⁻¹ ka). Vastaavasti tutkielmassa saatuja ADF-pitoisuuksia vertailtaessa vertailuartikkeleissa^{71,72,73} esitettyihin tuloksiin, huomattiin niiden olevan samalla tasolla. Vertailtaessa saatuja ADL-tuloksia Mönch-Tegeder *et al.*⁷¹ esitettyyn tuloshaarukkaan, joka oli 470 – 580 g kg⁻¹ ka, tulokset sisältyvät pitoisuusalueelle. Työssä saatu kuivaheinän ADL-pitoisuus oli vastaava kuin Mönch-Tegeder *et al.*⁷². Vertailutulos oli (543 ± 1,9 g kg⁻¹ ka). Kafle ja Chen⁷³ tulos oli työssä saatujen ADF-pitoisuuksien puolessa välissä. Vertailutulos oli 510 g kg⁻¹ ka.

10.3 Raakaproteiinin määrittäminen Kjeldahlin menetelmällä

Raakaproteiinin määrä näytteissä määritetään kokonaistyyppipitoisuuden perusteella. Typpi eroteltiin näytteestä, jonka jälkeen sen määrä määritettiin. Lopuksi laskettiin näytteen proteiinipitoisuus.

10.3.1 Näytteiden esikäsittely polttamalla sekä niiden neutralointi ja tislauksen

Tyypin määrittämistä varten poltettiin polttoputkissa polttolaitteessa ilmakeivattua näytettä 1 g. Putkiin lisättiin 15 ml väkevää rikkihappoa sekä katalyytiksi Kjeld-tabletti 3,5 g. Polttolämpötilana käytettiin 430 °C ja polttoaikana 1,5 h. Lämpötilan nousu tapahtui polttolaitteen ohjausyksikön ohjaamana.

Polton jälkeen putket siirrettiin jäähtymään vetokaappiin, jonka jälkeen huoneenlämpöinen putkissa oleva rikkihappo neutraloitiin ylimäärällä 40 %:sta NaOH -liuosta. Neutralointi tehtiin ennen vesihöyrytislausta vesihöyrytislaitteessa (Kuva 17). Tislauksen aikana näytteen sisältämä typpi siirrettiin vesihöyryyn avulla vastaanottoastiaan. Vastaanottoastiassa oli 4 % boorihappoa ja indikaattori bromkresoli-metyylipuna. Vesihöyrytislausta jatkettiin kunnes vastaanottoastian nesteen tilavuus oli reilu 200 ml.



Kuva 17. Kjeldahlin laitteiston Pronitro I -laite neutraloi ja vesihöyrytislää näytteen.

10.3.2 Typpipitoisuuden analysointi ja raakaproteiinipitoisuuden laskeminen

Kjeldahlin menetelmän viimeinen vaihe oli happo-emästitraus. Näytteestä eroteltu kokonaistyyppimäärä sijaitsi indikaattoria sisältävässä boorihapossa. Liuos titrattiin tarkasti 0,1 M vetykloorihapolla (HCl), kunnes liuoksen väri vaihtui turkoosinsinisestä vaaleankeltaiseksi. Titrantin kulutuksen avulla saatiin laskettua näytteen sisältämän typen määrä. Vastaavasti raakaproteiinin määrä, laskettiin kertomalla näytteestä riippuen kertoimella 6,25 tai 5,70 näytteen

sisältämän typen määrä. Korsirehunäytteet ja lantanäytteet kerrottiin 6,25 ja kauranäyte 5,70. (Esimerkki laskusta on liitteessä 4).

Taulukossa 11 on esitetty näytteiden sisältämät keskiarvoiset raakaproteiinipitoisuudet, standardipoikkeamiseen. Kaikkia rehunäytteitä analysoitiin 2 rinnakkaisnäytettä ja lantanäytteitä 6.

Taulukko 11. Raakaproteiinin pitoisuudet standardipoikkeamiseen näytteissä, g kg⁻¹ ka

Näyte	Raakaproteiini
Säilöheinä	70 ± 2
Säilöheinälanta	56 ± 6
Kuivaheinä	45,5 ± 1,3
Kuivaheinälanta	42 ± 9
Kaura	135 ± 2

10.3.3 Raakaproteiinipitoisuuksien tulostulosanalyysi ja vertailu

Proteiineilla on erittäin tärkeä osa hevosen elimistön solujen toiminnassa. Ne osallistuvat pääasiassa solujen erityyppisiin toimintoihin sekä rakenteina että välittäjäaineina. Ravinnon sisältämä proteiini pilkotaan aminohapoiksi ruuansulatuskanavassa, josta ne imeytyvät yksilön solujen käyttöön. Korsirehujen sisältämät raakaproteiinimäärät (Taulukko 11) poikkesivat keskenään toisistaan. Pitoisuusarvot poikkesivat keskenään 35 %, vaikka niittoajankohta oli samalla viikolla. Säilöheinän raakaproteiinipitoisuus oli (70 ± 2 g⁻¹ kg ka) ja kuivaheinän (45,5 ± 1,3 g kg⁻¹ ka). Vastaavasti kauran raakaproteiinipitoisuudeksi saatiin (135 ± 2 g kg⁻¹ ka). Kauran määrä hevosen ruokinnassa oli noin 10 % päivän kokonaisrehumäärästä. Analysoitujen näyte-erien rinnakkaisnäytteet olivat keskenään toistensa kaltaisia pitoisuuksiltaan. Erot eivät olleet suuret, mikä näkyy standardipoikkeaman pienuutena.

Lantanäytteiden raakaproteiinipitoisuudet (Taulukko 11) olivat muutaman gramman verran alhaisemmat kuin korsirehujen pitoisuudet. Säilöheinälannan raakaproteiinipitoisuus oli (56 ± 6 g kg⁻¹ ka) ja kuivaheinälannan (42 ± 9 g kg⁻¹ ka). Lannan raakaproteiinipitoisuus sisälsi myös kauran sulatuksen proteiinijäänteet.

Koeryhmän tammojen ja ruunien lantojen sisältämien raakaproteiinipitoisuuksien välillä nähtiin sukupuolijakauma kuivaheinälannoissa, mutta säilöheinälannassa ei ollut selvää jakaumaa. Siinä pitoisuuksien vaihtelu eri hevosten välillä oli satunnaista. Kuivaheinälannassa tammojen

raakaproteiinipitoisuudet olivat suuremmat kuin ruunien. Säilöheinälannassa vastaavasti alhaisin ja suurin pitoisuus olivat kahdella ruunalla. Säilöheinälannan alhaisimmalla ja korkeimmalla raakaproteiinipitoisuudella oli 25 % ero keskenään. Pitoisuudet olivat 47,4 g kg⁻¹ ka ja 62,8 g kg⁻¹ ka. Vastaavasti kuivaheinän lannassa se oli 35 %, Pitoisuudet olivat 33,8 g kg⁻¹ ka ja 52,4 g kg⁻¹ ka. Lantanäytteiden keskiarvoisten pitoisuuksien standardipoikkeamat olivat suuremmat kuin ravintolähteillä. Kummankin lantaerän alhaisin raakaproteiinipitoisuus oli hevosella numero 4, mikä kuvastaa parhaimmasta proteiinin imeytymisestä. Säilöheinälannan suurin pitoisuus analysoitiin hevoselta numero 6 ja kuivaheinälannan hevoselta numero 1. Analyysin perusteella voitiin päätellä, että yksilöiden rehunkäyttö voi olla hyvinkin erilaista, jopa säilöntämenetelmällä voi olla vaikutusta hevosten rehun hyödyntämiseen.

Kirjallisuudessa^{29,48,49,76} on raportoitu sekä jonkin verran suurempia että samalla tasolla olevia raakaproteiinipitoisuuksia kuin tässä tutkielmassa analysoidussa säilöheinärehussa (Taulukko 11). Yhtä alhaista pitoisuutta kuin kuivaheinässä oleva keskiarvoinen raakaproteiinipitoisuus ei ollut yhdessäkään vertailtavassa artikkelissa. Miyaji *et al.*⁴⁹ mukaan heidän tutkimuksissaan analysoitiin alhaisen laadun pilkottua ja jauhettua timoteihinää. Pilkotulle saatiin raakaproteiinipitoisuudeksi 63 g kg⁻¹ ka ja jauhetulle 66 g kg⁻¹ ka. Työssä käytetyt korsirehut olivat myöhään korjattuja alhaisen laadun rehuja, jotka olivat jauhettuja. Tämän tutkielman tulokset ovat vertailukeloiset Miyaji *et al.*⁴⁹ säilöheinälle esittämien tuloksien kanssa.

Tässä tutkielmassa analysoidun kauran sisältämän raakaproteiinin keskiarvoinen kokonaispitoisuus (Taulukko 11) oli hivenen suurempi kuin vertailtavissa artikkeleissa^{34,76}. Vertailtavissa artikkeleissa saatiin kauran raakaproteiinipitoisuuksiksi 126,3 g kg⁻¹ ka ja 130 g kg⁻¹ ka.

Lantanäytteiden sisältämien raakaproteiinipitoisuuksien odotettiin olevan alhaisempia kuin ravinnon ruokamassan kulkeuduttua ruuansulatuskanavan läpi (Taulukko 11). Kauran sisältämän raakaproteiinin reilu kaksinkertainen pitoisuus korsirehuihin nähden, lisäsi hevosen aineenvaihdunnalle tarjolla olevan raakaproteiinin määrää. Lantanäytteiden sisältämiä raakaproteiinipitoisuuksia vertailtavissa tuloksissa^{71,72,73} ei ollut kerrottu hevosten lantojen alkuperäisestä, ravinnon kemiallesta koostumuksesta, vaan ne oli analysoitu irrallisena elementtinä biomekaanisen metaanin lähtöaineena. Vertailtavien artikkelien tuloksissa raakaproteiinin pitoisuudet vaihtelivat suuresti. Pitoisuudet olivat pääasiassa suurempia kuin tässä tutkielmassa saadut tulokset. Pienin pitoisuus oli (12,14 g kg⁻¹ ka)⁷² ja suurin pitoisuus (52 g kg⁻¹ ka)⁷¹. Tämän tutkielman säilöheinälannan raakaproteiinipitoisuus (Taulukko 11) asettui vertailtavien tulosten pitoisuushaarukkaan, mutta kuivaheinälannan pitoisuus oli alle pienimmän vertailupitoisuuden.

Kuivaheinän raakaproteiinipitoisuus oli hyvin alhainen, joten sen lannan pitoisuuskaan ei voinut olla suuri. Pitoisuus oli jo lähtökohtaisesti alhaisempi kuin alin vertailulantojen raakaproteiinipitoisuus.

10.4 Makro- ja mikromineraalien määrittäminen

Jotta päästiin määrittämään tämän tutkielman makro- ja mikromineraalien pitoisuudet, määritettiin ensin näytteiden sisältämän tuhkan määrä kaikissa erityyppisissä näytteissä. Ensimmäisessä vaiheessa punnittiin taarattuihin posliiniupokkaisiin tarkasti 1 g lämpökaapissa 105 °C yön yli kuivattuja näytteitä. Näytteet tuhkistettiin muhveliuunissa. Ensin uunin lämpötilaanostettiin hitaasti, kunnes lämpötila oli 550 °C. Sen jälkeen näytteitä pidettiin 550 °C lämpötilassa 3 tuntia, minkä jälkeen ne jäähdytettiin ja punnittiin. Punnitustulosten perusteella määritettiin näytteiden sisältämät tuhkan ja orgaanisen aineksen määrät (Liite 1). Lisäksi tulosten perusteella arvioitiin tarvittavat näytemäärät useamman rinnakkaisnäytteen mineraalimäärittämistä varten.

10.4.1 Orgaanista ainesta sisältävien näytteiden esikäsittely mikroaaltouuniavusteisesti

Makro- ja mikromineraalien määrittämistä varten tuhkistettiin kuivattuja näytteitä siten, että saatiin kaikista lantanäytteistä kaksi, kauranäytteestä kolme ja molemmista korsirehunäytteistä kolme rinnakkaisnäytettä. Erityyppiset näytteet tuhkistettiin ryhmittäin posliinisissa haihdutusmaljoissa. Koska näytteet sisälsivät orgaanista ainesta, piti lämmön nostaminen tehdä hitaasti, jotta näytteet eivät syttyneet palamaan. Näytteiden tuhkistuslämpötilana käytettiin 550 °C, jossa niitä pidettiin 3 tuntia. Näytteet punnittiin jäähdytyksen jälkeen, minkä yhteydessä huomattiin, etteivät korsirehu- ja kauranäytteet olleet tuhkistuneet kokonaan. Näytteet tuhkistettiin samalla ohjelmalla uudelleen.

Tuhkanäytteitä punnittiin tarkasti 0,2 g suoraan mikroastioihin. Ensimmäisessä vaiheessa astioihin lisättiin vahvaa typpihappoa (HNO₃) 8 ml ja vetyfluoridihappoa (HF) 1,2 ml (tippapullosta 20 tippaa). Astiat suljettiin huolellisesti ja pakattiin mikroaaltouuniin (Kuva18). Ohjelmalla käytettiin kiinteän näytteen ohjelmaa, jossa tehona oli 850 W ja lämpötilana 175 °C. Lämpötilaa nostettiin 5 min ja 30 s ajan, jonka jälkeen lämpötila pidettiin 175 °C 4 min ja 30 s ajan. Toisessa vaiheessa lisättiin jäähdytettyihin astioihin 4 % boorihappo 10 ml neutraloimaan ylimääräinen HF. Mikroaaltouunissa käytettiin tällöin ohjelmaa H₃BO₃ ja HF neutralisaatio, jossa tehona käytettiin

400 – 800 W ja lämpötilana 170 °C. Mikroaaltouunin rikkoutumisen vuoksi jouduttiin turvautumaan muihin mahdollisiin eri laitteisiin. Mikroaaltouuneissa käytettiin hieman eri ohjelmia. Laitteesta riippumatta näytteet pyrittiin käsittelemään mahdollisimman samalla tavalla. Laiterikon seurauksena yhden erän näytteet neutraloitiin ultraääniavusteisesti 4 kertaa 3 minuutin ajan ohjelmaa käyttäen.



Kuva 18. Tuhkanäytteiden mikroaaltouuniavusteinen hajotus, Mars 5 mikroaaltouunissa.

Näytteet suodatettiin 50 ml mittapulloihin Whatman 41 suodatuspaperin läpi, jotta silikaattien muodostama hyytelö saatiin pois muuten kirkkaasta liuoksesta. Liuos laimennettiin täyttämällä mittapullo mittatilavuuteen ELGA-vedellä.

10.4.2 Makro- ja mikromineraalien analysointi ja tulokset

Makro- ja mikromineraalit analysoitiin ICP-OES-tekniikkaa käyttäen. Ensimmäisenä näyteliuokset analysoitiin raakana semikvantitatiivisesti. Näin haluttiin varmistaa eri alkuaineiden kalibraatioalueiden järjestyksen. Semikvantitatiivisen analyysin perusteella makromineraalit analysoitiin kymmenkertaisista laimennoksista ja mikromineraalit raakaliuoksista. Varsinaista analyysiä varten valmistettiin standardiliuoksia semikvantitatiivisen analyysin tulosten perusteella 3 eri pitoisuutta sekä nollanäyte. Sumutinkammiona käytettiin HF:n kestävästä muovista valmistettua

syklonista sumutinkammiota ja GemCone Slow Flow sumutinta, koska liuokset sisälsivät HF:a. Taulukossa 12 on esitetty mittauksissa käytetyt eri mineraalien mittausaallonpituudet sekä mittaussuunnat aksiaalinen (A) ja radiaalinen (R).

Taulukko 12. Mittauksissa käytetyt mittausaallonpituudet ja mittaussuunnat aksiaalinen (A) ja radiaalinen (R)

Mineraali	Mittausaallonpituus, nm	Mittaussuunta
Ca	317,933	R
P	213,617	R
Mg	285,213	R
K	766,490	R
Na	589,59	R
Co	228,616	A
Cu	327,393	A
Fe	238,240	A
Mn	257,610	A
Zn	206,200	A

10.4.2.1 Kalibrointi ja siitä saadut arvot

Ennen näytteiden mittausta, mitattiin nollanäyte sekä standardinäytteet pienimmästä pitoisuudesta suurimpaan. Kalibrointimittausten päätteeksi ICP-OES:n ohjelma laski jokaiselle mineraalille pitoisuuksien mittaustarkkuuteen perustuvan lineaarisen suoran korrelaatiokertoimen R . Lisäksi jokaiselle mineraalille piirrettiin Microsoftin Excel-laskentaohjelmalla kuvaaja ja määritettiin suoran kulmakerroin b sekä sille standardipoikkeama, jotta voitiin laskea LOD ja LOQ. Kaikki edellä esitetyt asiat on esitetty taulukoissa 13 ja 14. Taulukossa 13 on esitetty säilöheinän (SH), kauran (K) ja säilöheinälannan (SH-lanta) arvot sekä huomautuksissa mainittu näytteet, joissa oli alhaiset mittaustulokset. (Esimerkki laskutoimituksesta on liitteessä 5).

Taulukko 13: SH, K ja SH-lanta: mitattujen mineraalien kalibraatioalueet, korrelaatiokertoimet, LOD ja LOQ sekä näytteet, joissa oli alhaiset mittaustulokset

Mineraali	Kalibraatioalue, mg l ⁻¹	R	LOD	LOQ	Alhainen mittaus
Ca	2 - 50	0,999956	0,017826	0,059419	
P	4 - 100	0,999996	0,002585	0,037369	
Mg	2 - 50	0,999997	0,00497	0,016567	
K	4 - 100	0,999987	0,071339	0,237797	
Na	2 - 50	0,999994	0,047653	0,158844	
Co	0,008 - 0,2	0,999932	0,098772	0,329241	SH, K ja SH-lanta alle LOD
Cu	0,08 - 2	0,999932	0,01975	0,065834	
Fe	2 - 50	0,999986	0,010739	0,035797	
Mn	0,8 - 20	0,999978	0,014002	0,046672	
Zn	0,4 - 10	0,999997	0,004568	0,015227	

Taulukossa 14 on esitetty kuivaheinän (KH) ja kuivaheinälannan (KH-lanta) arvot sekä huomautuksissa mainittu näytteet, joissa oli alhaiset mittaustulokset.

Taulukko 14. KH ja KH-lanta: mitattujen mineraalien korrelaatiokertoimet, LOD ja LOQ sekä näytteet joissa oli alhaiset mittaustulokset

Mineraali	Kalibrointialue, mg l ⁻¹	R	LOD	LOQ	Alhainen mittaus
Ca	2 - 50	0,999997	0,008612	0,028705	
P	4 - 100	0,999998	0,004363	0,014545	
Mg	2 - 50	0,999999	0,002526	0,008421	
K	4 - 100	0,999164	0,089437	0,298122	
Na	2 - 50	0,999997	0,055232	0,184107	
Co	0,008 - 0,2	0,999818	0,07056	0,235201	KH ja KH-lanta alle LOD
Cu	0,08 - 2	0,999866	0,034076	0,114252	
Fe	2 - 50	0,999993	0,006921	0,023071	
Mn	0,8 - 20	0,999992	0,008035	0,026783	
Zn	0,4 - 10	0,999998	0,004838	0,016125	

10.4.2.2 Näytteiden sisältämät mineraalipitoisuudet

Taulukossa 15 on esitetty näytteiden makro- ja mikromineraalipitoisuuksien keskiarvoiset pitoisuudet standardipoikkeamiseen. Kaikista rehunäytteistä analysoitiin 3 rinnakkaisnäytettä ja jokaisen kuuden hevosen lantanäytteestä 2 rinnakkaisnäytettä, joista laskettiin keskiarvot.

Taulukko 15. Näytteiden sisältämät makro- ja mikromineraalipitoisuudet standardipoikkeamiseen, g kg⁻¹ ka (Ca – Na) ja mg kg⁻¹ ka (Co – Zn)

Mineraali	Säilöheinä	Säilöheinälanta	Kuivaheinä	Kuivaheinälanta	Kaura
Ca	1,35 ± 0,05	2,9 ± 0,5	1,260 ± 0,013	2,3 ± 0,4	0,58 ± 0,08
P	0,8 ± 0,3	4,2 ± 0,9	1,370 ± 0,011	3,4 ± 0,9	4,1 ± 0,6
Mg	0,48 ± 0,02	1,4 ± 0,3	0,744 ± 0,006	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2
K	4,4 ± 0,4	9 ± 3	10,1 ± 0,3	7 ± 2	4,0 ± 0,4
Na	0,030 ± 0,012	1,2 ± 0,5	0,08 ± 0,02	0,6 ± 0,3	0,0185 ± 0,0015
Co	0,04 ± 0,06	0,28 ± 0,08	0,05 ± 0,03	0,31 ± 0,09	-
Cu	1,8 ± 0,3	11 ± 5	2,8 ± 0,2	8 ± 3	5,6 ± 1,2
Fe	34 ± 3	430 ± 70	23,5 ± 0,3	350 ± 140	62 ± 14
Mn	31,1 ± 1,1	130 ± 20	36,6 ± 0,6	120 ± 40	65 ± 10
Zn	7,2 ± 0,3	48 ± 9	13,8 ± 1,1	42 ± 11	34 ± 6

10.4.3 Näytteiden mineraalipitoisuuksien tulosanalyysi ja vertailu

Makro- ja mikromineraalien saanti on hevoselle välttämätöntä. Perusravinnon olisi hyvä sisältää hevosen tarvitsemat mineraalit, koska ne ovat tällöin ravitsemuksellisesti parhaimmassa muodossa. Korsirehunäytteiden mineraalipitoisuuksia (Taulukko 15) vertailtaessa huomattiin, että kuivaheinästä analysoiduista mineraaleista lähes kaikki mineraalipitoisuudet olivat jonkin verran korkeammat kuin säilöheinässä. Korkein pitoisuusero oli yli kaksinkertainen pitoisuus, joka oli kaliumilla. Poikkeuksena olivat säilöheinän sisältämien Ca:n ja Fe:n pitoisuudet, jotka olivat korkeammat kuin kuivaheinässä. Koska korsirehut oli niitetty samalla viikolla, niittoajankohta ei voinut olla eron vaikuttava tekijä, mikä olisi säädellyt heinien mineraalikoostumusta. Korsirehujen mineraalikoostumukseen vaikutti todennäköisesti maaperän luontainen mineraalipitoisuus sekä maaperän lannoittaminen tai lannoittamattomuus. Kauranäytteen sisältämien mineraalien pitoisuudet pystyttiin määrittämään Co-pitoisuutta lukuunottamatta. Näytteiden Co-pitoisuudet olivat alle LOD.

Lantanäytteiden keskiarvoiset mineraalipitoisuudet (Taulukko 15) olivat kauttaaltaan suurempia kuin rehujen keskiarvoiset mineraalipitoisuudet, paitsi kaliumin kuivaheinälannan ja kuivaheinän pitoisuussuhde oli alle yhden. Joidenkin mineraalien pitoisuudet olivat kohtuullisesti suuremmat, mutta joidenkin pitoisuudet erottuivat huomattavan suuruutensa ansiosta. Suuret pitoisuussuhteet säilöheinän ja säilöheinälannan välillä olivat makromineraali Na:lla sekä mikromineraaleilla Fe ja Zn. Nämä suuret pitoisuussuhteet vaihtelivat 12-kertaisesta jopa 76-kertaiseen pitoisuuteen asti. Kuivaheinälannan ja kuivaheinän mineraalipitoisuuksissa vain Fe:n pitoisuussuhde oli suuri. Se oli

12-kertainen. Lantanäytteiden sisältämien mineraalipitoisuuksien suhteessa kauran mineraalipitoisuuksiin havaittiin, että pääasiassa pitoisuudet olivat kohtuullisesti suurempia kuin kauranäytteen mineraalipitoisuudet. Tuloksia käsiteltäessä havaittiin kolme poikkeamaa: P- ja Mg-pitoisuudet lantanäytteissä olivat pienemmät muutaman prosentin ja vastaavasti Na-pitoisuus lantanäytteessä oli 32-kertainen kauranäytteen pitoisuuteen nähden.

Joidenkin mineraalien kohdalla esiintyi tammojen ja ruunien välistä pitoisuusjakaumaa. Sitä esiintyi kuitenkin vain kolmessa mineraalissa kymmenestä. Kaikki nämä pitoisuusjakautuneet mineraalit eivät olleet samat eri lantaerissä. Vain P:n pitoisuuksissa havaittiin molemmissa lantaerissä tammojen ja ruunien välinen pitoisuusjakauma, joten yleisesti karkeasti arvioituna tammojen ja ruunien välillä ei esiintynyt sukupuolijakaumaa. Säilöheinälantojen pienintä mineraalipitoisuutta esiintyi eniten hevosella numero 3, hevosella numero 1 oli pienin Co- ja Fe-pitoisuus. Hevosella numero 1 ei saatu Co-pitoisuutta lainkaan, koska se oli alhaisempi kuin LOD. Säilöheinälantojen suurimmat mineraalipitoisuudet analysoitiin pääasiassa hevosen numero 4 lannasta. Hevosten numero 1, 2 ja 6 lannat sisälsivät K, Na, Fe, Mn ja Zn mineraalien suurimmat keskimääräiset pitoisuudet. Vastaavasti kuivaheinälannoista eniten pienimpiä keskimääräisiä pitoisuuksia analysoitiin hevosella numero 1. Lisäksi pienimpiä mineraalipitoisuuksia oli hevosilla numero 5 ja 6 mineraaleissa Ca, Co, Cu ja Fe. Kuivaheinälannoista suurimmat mineraalipitoisuudet havaittiin hevosilla numero 3, 4 ja 6. Pääasiassa suurimmat pitoisuudet olivat hevosella numero 4. Hevosilla numero 3 ja 6 suurimmat pitoisuudet olivat mineraaleissa K, Co ja Fe. Kummassakaan lantaerässä pienintä mineraalipitoisuutta ei esiintynyt hevosilla numero 2 ja 4. Vastaavasti suurinta pitoisuutta ei esiintynyt hevosella numero 5. Edellä esitettyjen tulosten perusteella voidaan arvioida, että jokaisen hevosen mineraalitarve on yksilöllinen. Ravinnon on hyvä sisältää mineraaleja monipuolisesti tarpeellinen määrä. Jos perusrehut eivät sisällä tarpeellista määrää mineraaleja, tulee mineraalitäydennys antaa perusruokinnan lisänä. Yliruokintaa tulee kuitenkin välttää, sillä lannan mukana mineraaliylimäärä todennäköisesti päätyy takaisin maaperään. Lanta sisältää paljon muitakin mineraaleja kuin työssä analysoidut hevoselle ravitsemuksellisesti tärkeät mineraalit.

Vertailtaessa tässä tutkielmassa korsirehuista saatuja analysoitujen makro- ja mikromineraalien pitoisuuksia (Taulukko 15) vertailuartikkelien^{32,33} tuloksiin, huomattiin kaikkien mineraalien pitoisuuksien olevan alhaisemmat kuin keskiarvoiset vertailupitoisuudet. Zhao ja Müller³² olivat tutkineet suuren korsirehunäytemäärän ruotsalaista ja norjalaista korsirehua ja ilmoittivat artikkelissaan keskiarvoisten pitoisuuksien lisäksi mineraalien maksimi- ja minimiarvot. Säilöheinänäytteen sisältämistä analysoiduista mineraaleista Na-, Fe- ja Zn-pitoisuudet eivät mahtuneet esitettyyn haarukkaan, vaan olivat alhaisemmat. Tässä tutkielmassa saadun Cu-

pitoisuuden havaittiin olevan alarajalla 1,8 mg kg⁻¹ ka. Kaikki muut mineraalipitoisuudet olivat artikkelissa esitettyjen maksimi ja minimi pitoisuuksien välissä. Vastaavasti kuivaheinästä analysoiduista mineraalipitoisuuksista Na- ja Fe-pitoisuudet eivät myöskään mahtuneet esitettyyn haarukkaan, vaan olivat alhaisemmat. Zn-pitoisuuden havaittiin olevan alarajalla 13 mg kg⁻¹ ka. Kaikki muut mineraalipitoisuudet olivat maksimi ja minimi pitoisuuksien välissä. Pirhofer-Walzl *et al.*³³ olivat tutkineet artikkelissaan osana tutkimusta Tanskassa kasvatettavaa heinää. Tässä tutkielmassa saadut tulokset olivat vertailukelpoiset Pirhofer-Walzl *et al.*³³ artikkelissa saatujen tulosten kanssa. Vaikka kummankin vertailtavan artikkelin tutkimukset oli tehty pohjoismaissa, yllätti tässä tutkielmassa saatujen mineraalipitoisuuksien alhaisuus. Suomen viljelyspeltojen tiedetään yleisesti olevan mineraalittomampia kuin muiden pohjoismaiden, mikä on yksi lisäsy teettä maaperäanalyysi EU-direktiivin lisäksi.

Kauran sisältämien mineraalien pitoisuudet (Taulukko 15) olivat pääsääntöisesti samalla tasolla Lásztityn⁷⁷ vertailuartikkelissa esitettyjen tulosten kanssa. Ainoana poikkeuksena oli makromineraali Na, jonka analysoitu pitoisuus oli noin 5 % vertailupitoisuudesta. Se oli huomattavan alhainen.

Vertailtaessa tässä tutkielmassa analysoitujen lantanäytteiden sisältämien makro- ja mikromineraalien keskiarvoisia pitoisuuksia (Taulukko 15) Chastainin ja Mooren⁷⁸ vertailuartikkelin tuloksiin, havaittiin saatujen keskiarvoisten makromineraalipitoisuuksien olevan pääasiassa pitoisuuksiltaan pienempiä kuin artikkelissa. Poikkeuksena olivat kummankin lantaerän Na:n sekä kuivaheinälannan P:n pitoisuudet. Näiden makromineraalien keskiarvoiset pitoisuudet asettuivat artikkelissa esitettyjen eri hevostiloilta saatujen arvojen kanssa samalle tasolle. Vastaavasti tässä tutkielmassa saadut mikromineraalien Cu:n ja Zn:n pitoisuudet olivat vertailuarvoja alhaisemmat. Fe:n ja Mn:n pitoisuudet asettuivat vertailutulosten tasolle. Co:lle ei esitetty vertailutulosta. Vertailuartikkelissa kokonaisfosforin ja -kaliumin pitoisuudet esitettiin epäorgaanisina yhdisteinä, ei puhtaina alkuaineina.

11 YHTEENVETO

Vaikka tämän tutkielman kaltaista tutkimusta ei löytynyt aineistolähteistä, saatiin tutkielman eri vaiheiden tuloksien vertailuun vertailupitoisuuksia hieman erityyppisten tutkimusten tuloksista. Niiden tukemana voitiin päätellä, että tässä tutkielmassa saadut tulokset olivat järkeviä. Kyseenalaiset tulokset saatiin rasvahappojen osalta, jotka olivat huomattavan alhaiset.

Todennäköinen syy pitoisuuksien alhaisuuteen oli liian lyhyt Soxhlet -uuttoaika, jolloin kaikki rasva-ainekset eivät uuttuneet liuottimeen, vaan jäivät edelleen näytemassaan. Uuttoajan olisi pitänyt olla 6 tuntia eikä 4. Kauran sisältämän glukoosin määrän jakautuminen tärkkelykseen ja rakenteelliseen (selluloosa) glukoosiin jäi hieman epäselväksi, koska saatavilla olevasta kirjallisuudesta ei löytynyt vastaavaa täsmällistä tietoa.

Tutkielmassa saatujen tulosten perusteella hevosen ravinnon rasvahappokoostumus muuttui, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi. Tyydyttymättömien ja monitydyttymättömien rasvahappojen enemmistö oli vaihtunut tyydyttyneiden rasvahappojen enemmistöön, koska paksusuolen mikrobit olivat vapauttaneet tyydyttyneitä rasvahappoja hyödyntäessään soluseinän hiilihydraatteja. Hevonen käyttää ruokavalionsa liukoiset sokerit (glukoosi, fruktoosi, sakkaroosi ja tärkkelys) erittäin hyvin hyödykseen. Ravinnon sisältämien rakenteellisten hiilihydraattien hyödyntämistä oli vaikea arvioida, etenkin hevosten ruokaillessa myös sisätiloissa. Sisäruokinnassa oli häiritsevänä tekijänä karsinan kuivikkeet, koska jokainen hevonen syö karsinansa kuivikkeita tahattomasti tai tarkoituksella, kun kuiviketta joutuu ruuan mukana ruuansulatukseen. Se vääristää rakenteellisten hiilihydraattien pitoisuutta lannassa, sillä kuivikkeet sisältävät aina luonnonmateriaalina paljon orgaanista ainesta ja sulamattomia kuiturakenteita.

Tutkielmassa saatujen tulosten perusteella hevosen ravinnon sisältämä raakaproteiinipitoisuuden muutos oli yllättävän pieni, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi. Hevosten saama kaura sisälsi reilun kaksinkertaisen pitoisuuden raakaproteiinia, kauran määrä koko ruokamäärästä oli vain noin kymmenesosan, mikä ei nostanut kuitenkaan tarjolla olleen raakaproteiinin määrää paljoa. Syödyn karsinakuivikkeen sisältämä typpi oli voinut osaltaan vaikuttaa raakaproteiinipitoisuuden vähäiseen muutokseen, kun ruokamassa oli kulkeutunut ruuansulatuskanavan läpi.

Tässä tutkielmassa käytetyn hevosten ravinnon mineraalipitoisuudet olivat alhaiset. Lantanäytteiden mineraalipitoisuudet olivat pääasiassa korkeammat kuin ravinnon pitoisuudet. Ainoana poikkeavana mineraalina oli kalium kuivaheinässä, jonka pitoisuus pieneni ruokamassan kulkeutuessa ruuansulatuskanavan läpi. Orgaanisten ravintoaineiden väheneminen ruokamassasta kevensi ruokamassan painoa ja epäorgaanisten aineiden suhde näytteen massaan kasvoi. Natriumin ja raudan pitoisuudet olivat lantanäytteissä huomattavasti suuremmat kuin hevosten ravinnossa. Hevosten karsinan kuivikkeena käytetty turve sisältää yleensä paljon rautaa, mikä voi selittää

osittain korkean rautapitoisuuden. Vertailuartikkelissa⁷⁸ esitettiin hyvin samanlaisia tuloksia sekä natrimin että raudan osalta.

Tämän tutkielman perusteella voidaan päätellä, että jokaisen hevosen ruuansulatus on ainutlaatuinen yksikkö. Toinen pystyy hyödyntämään paremmin proteiinit, kun taas toinen mineraalit tai sokerit. Jokaisen hevosen omistajan tulisi tuntea hevosensa ruuansulatuksen hyvät ja heikot puolet ja rakentaa yksilöllinen ruokavalio sen tarpeiden mukaan.

Taulukkoon 16 on koottu kooste eri ravintoaineita parhaiten ja heikoimmin hyödyntävistä hevosista.

Taulukko 16. Kooste ravintoaineiden parhaimmin ja heikoimmin hyödyntävistä hevosista: * parhaiten hyödyntäjä ja - heikoimmin hyödyntäjä. Säilöheinälanta (SH-1) ja kuivaheinälanta (SH-1)

Ravintoaine	1		2		3		4		5		6	
	SH-1	KH-1	SH-1	KH-1	SH-1	KH-1	SH-1	KH-1	SH-1	KH-1	SH-1	KH-1
Rasvahapot	*	*					-	-				
Liukoiset sokerit		*			*			-				-
Liukoinen glukoosi					*			-				*
ADL	*					-			-			*
Hemiselluloosa	*	-		*		-			-			-
Selluloosa	-		*			*		-				-
Raakaproteiini		-					*	*				-
Ca					*			-	-			*
P		*			*			-	-			
Mg		*			*			-	-			
K		*			*							-
Na	-	*										*
Co	*					-	-			*		
Cu					*			-	-			*
Fe	*		-			-				*		
Mn		*			*							-
Zn		*	-		*							-

KIRJALLISUUSLUETTELO

1. Warren, L.K., From oats to road apples: Modifying horse manure through nutrition. Conf. Proc. 2006 4th MID-ATLANTIC NUTRITION CONF, Timonium, Maryland, USA, 29-30.3.2006, ss. 62-70.
2. Menard, C., Duncan, P., Fleurance, G., Georges, J-Y. ja Lila, M., Comparative foraging and nutrition of horses and cattle in European wetlands, *J. of Appl. Ecology*, **2002**, 39 (1), 120-133.
3. Cymbaluk, N. F., Comparison of forage digestion by cattle and horses, *Can. J. Animal Sci.*, **1990**, 70 (2), 601-610.
4. Rosenlew. K., *Ruokinnan vaikutuksesta hevosen terveyteen*, Diploma in Equine Science, D8-2690-EQ, Suomennettu versio, 2009.
5. Nelson, D. L. ja Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*; 6. painos. Macmillan Higher Education, UK, 2013, a) ss. 115-151 b) 243-280 c) 357-370.
6. Heikkinen, M., *Kuiva-ainepitoisuuden ja säilöntäainekäsittelyn vaikutus nurmirehun fruktaanipitoisuuteen*, Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos, Helsinki, 2010.
7. Pollitt, C.C., Kyaw-Tanner, M., French, K. R., van Eps, A. W., Hendriksz, J. K. ja Daradka, Equine Laminitis, *Am. Assoc. Equine Proct* , **2010**, 49, 103-115.
8. Ritsema, T. ja Smeekens, S. C. M., Engineering fructan metabolism in plants, *J. Plant Physiol.*, **2003**, 160, 811-820.
9. Reese, J. B., Urry, L.A., Cain M. L., Wasserman, S.A., Minorsky, P. V. ja Jackson, R. B., *Campbell Biology*, 9. painos, Pearson, San Fransisco, USA, 2011, a) ss. 115-120 b) 831-835 c) 1244.
10. Kärkönen, A., Seppänen, M., Häggmann, H., Manninen, O., Joki-Tokola, E. ja Virkajärvi, P., Nurmirehu helpommin sulavaksi: sekundaarisoluseinän syntymisen säätely, *Maataloustieteen päivät 2010*, 12-13.1.2010, Viikki, Helsinki, 2010.
11. Alatalo T., *Olkimassa biokaasulaitoksen raaka-aineena*, Diplomityö, Tampereen teknillinen yliopisto, ympäristöbiotekniikan laitos, Tampere, 2013.
12. Taleva-Naakka S., *Fenyylipropanoidien erityisesti ferulahappojen hapettavat kytkentymisreaktiot kasvin soluseinän biosynteesissä*, Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto, kemian laitos, Helsinki, 2007.

13. Vanninen, M., *Tyypillisten biomassamateriaalien kemiallinen koostumus*, Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, Jyväskylä, 2009.
14. Campell, M. K. ja Farrell, S. O., *Biochemistry*; 6. painos, Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, USA, 2008, a) ss. 87- 92 b) 471 c) 607-618.
15. Smith, J. G., *Organic Chemistry*, 3. painos, McCraw-Hill Education, New York, USA, 2011, a) ss. 97-98 b) 366-369.
16. Karsten, H. D ja Baer, D. J., Grass and Human Nutrition. Kirjassa Waller, W. F., ja Fales S. L. (toim.) *Grassland: Quintness and Strenght for a New American Agriculture*, USA, 2009, s. 89.
17. Nadeau, J., Hay Analysis: Its Importance and Interpretation, *Extension Articles*, **2006**, *12*.
18. Uotila, R., *Karkearehuanalyysien käyttö hevosten ruokinnan suunnittelussa*, Opinnäytetyö, Hämeen ammattikorkeakoulu, Mustiala, 2010.
19. Martin-Rosset, W., Andrieu, J., Jestin, M., Macheboeuf, D. ja Andueza, D., *Forages and grazing in horse nutrition*, Wageningen Academic Publishers, Netherland, 2012, ss. 83-95.
20. Duberstein, K. J. ja Johnson, E. L., *How to Feed a Horse: Understanding Basic Principles of Horse Nutrition*, University of Georgia, Cooperative Extension, USA, Georgia, (2009).
21. Raessler, M., Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants, *Trends in Anal. Chem.*, **2011**, *30* (11), 1833-1843.
22. Pollock, C. J., Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants, *New Phytologist*, **1986**, *104* (1), 1-9.
23. Pollock, C. J. ja Cairns, A. J., Fructan metabolism in grasses and cereals, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **1991**, *42*, 77-101.
24. Vijn, I. ja Smeekens, S., Fructans: More Than a Reserve Carbohydrate?, *Plant Physiol.*, **1999**, *120*, 351-359.
25. Suomen hevostietokeskus ry: Hevosten ruokintakoulu osa III, (2015).
<http://www.hevostietokeskus.fi/index.php?id=1021> (viitattu 04.08.2017)
26. Åman, P., The variation in chemical composition of Swedish oats, *Acta Agric. Scand.*, **1987**, *37*, 347-352.

27. Xu, F., Sun, J. X., Geng, Z. C., Liu, C. F., Ren, J. L., Sun, R. C., Fowler, P. ja Baird, M. S., Comparative study of water-soluble and alkali-soluble hemiselluloses from perennial ryegrass leaves (*Lolium perenne*), *Carb. Pol.*, **2007**, *67*, 56-65.
28. Morrison, I. M., Changes in the lignin and hemisellulose concentrations of ten varieties of temperate grasses with increasing maturity. *Grass and Forage Science*, **1980**, *35*, 287-293.
29. Woodward, A. D., Nielsen, B. D., Liesman, J., Lavin, T. ja Trottier, N. L., Protein quality and utilization of timothy, oat-supplemented timothy, and alfalfa at differing harvest maturities in exercised Arabian horses, *J. Animal Sci.*, **2011**, *89* (12), 4081-4091.
30. Gibbs, P. G., Potter, G. T., Schelling, J. L., Kreider, J. L. ja Boyd, C. L., Digestion of hay protein in different segments of the equine digestive track, *J. Animal Sci.*, **1987**, *66* (2), 400-406.
31. Harris, P.A., *Comparison of the digestible energy (DE) and net energy (NE) systems for horses*, Waltham Center for Pet Nutrition, Leicestershire, U.K (1999), ss.199-215.
32. Zhao, X. ja Müller, C. E., Macro- and micromineral content of wrapped forages for horses, *Grass and Forage Science*, **2015**, *71*, 195-207.
33. Pirhofer-Walzl, K., Sjøgaard, K., Høgh-Jensen, H., Eriksen, J., Sanderson, M. A., Rasmussen, J. ja Rasmussen J., Forage herbs improve mineral conception of grassland herbage, *Grass and Forage Science*, **2011**, *66* (3), 415-423.
34. Zeyner, A., Geigler, C. ja Dittrich, A., Effects of hay intake and feeding sequence on variable in faeces and faecal water (dry matter, pH-value, organic acids, ammonia, buffering capacity) of horses, *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, **2004**, *88*, 7-19.
35. Pearson, R. A., Archibald, R. F. ja Muirhead, R. H., The effect of forage quality and level of feeding on digestibility and gastrointestinal transit time of oat straw and alfalfa given to ponies and donkeys, *British J. Nutr.*, **2001**, *85* (5), 599-606.
36. Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. ja Boerjan, W., Lignin Biosynthesis and Structure, *Am. Soc. Plant Biol.*, **2010**, *153*, 895-905.
37. Saastamoinen, M., Laadukas rehu ruokki hevosien, *Maaseudun tiede*, **2008**, *65* (2), 4.
38. Sipilä, A. ja Saarisalo, E., Rehun säilöntä, *Suomen Nurmiyhdistyksen ja MTT:n julkaisusarja*, Julkaistu 31.5.2006.
http://www.nurmiyhdistys.fi/Nurmitieto/NT_3-1-1.pdf (viitattu 01.08.2017).

39. Puhakka, L., *Eri maitohappobakteerien ja niiden annostustason vaikutus säilörehun käymislaatuun ja aerobiseen stabiilisuuteen*, Pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto, maataloustieteiden laitos, Helsinki, (2011).
40. Naujeck, A., Hill, J. ja Gibb, M. J., Influence of sward height on diet selection by horses, *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **2005**, 90 (1), 49-63.
41. Kohler, G.O., The effect of stage of growth on the chemistry of the grasses, *J. Biol. Chem.*, **1944**, 152, 215-223.
42. Hill, J., Impacts of nutritional technology on feeds offered to horses: A review of effects of processing on voluntary intake, digesta characteristics and feed utilisation, *Ani. Feed Sci.*, **2007**, 138, 92-117.
43. Julliand, V., De Fombelle, A. ja Varloud, M., Starch digestion in horses: The impact of feed processing, *Liv. Sci.*, **2006**, 100, 44-52.
44. Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M. ja Helliwell, S., Oat Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1999**, 76 (2), 159-169.
45. Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M. ja Helliwell, S., Structure and Pasting Properties of Oat Starch, *Cereal Chem.*, **1998**, 75 (3), 273-281.
46. Suomen hevostietokeskus ry: Väikirehujen haittavaikutuksia.
<http://www.hevostietokeskus.fi/index.php?id=824&kieli=3> (viitattu 02.09.2017).
47. Suomen Hevostietokeskus ry: Hevosen ruokintakoulu osa I, (2015).
<http://www.hevostietokeskus.fi/index.php?id=1021> (viitattu 04.08.2017).
48. Jančík, F., Homolka, P., Čermák, B. ja Lád, F., Determination of indigestible neutral detergent fiber contents of grasses and its prediction from chemical composition, *Czech J. Animal Sci.*, **2008**, 53 (3), 128-135.
49. Miyaji, M., Ueda, K., Hata, H. ja Kondo, S., Effects of quality and physical form of hay on mean retention time of digesta and total digestibility in horses, *Ani. Feed Sci.*, **2011**, 165, 61-67.
50. Eckert, J. V., Myer, R. O., Warren, L.K. ja Brendemuhl, J. H., Digestibility and nutrient retention of perennial peanut and bermudagrass hays for mature horses, *J. Animal Sci.*, **2010**, 88, 2055-2061.
51. Goachet, A.G., Philippeau, C., Varloud, M. ja Julliand, V., Adaptations to standard approaches for measuring total tract apparent digestibility and gastro-intestinal retention time in horses in training, *Ani. Feed Sci.*, **2009**, 152, 141-151.

52. Vesiaho, A., *Hevosten yksilökarsinoiden ja pihattojen kuivikkeet*, Opinnäytetyö, Jyväskylän ammattikorkeakoulu, Jyväskylä, 2015.
53. Seilab Oy, Karkearehuanalyysien tulkintaohjeistus: Hevoset
<http://www.seilab.fi/tutkimukset/.rehututkimukset.html/48089.pdf> (viitattu 10.10.2017).
54. Luque de Castro, M. D. ja Garcia-Ayuso, L. E., Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *369* (1-2), 1-10.
55. Palmquist, D.L. ja Jenkins, T.C., Challenges with fats and fatty acids methods, *J. Animal Sci.*, **2003**, *81*, 3250-3254.
56. Somogyi, M.A., A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.*, **1945**, *160*, 61-68.
57. Salo, M-L., *Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces*. Suomen maataloustieteellisen seuran julkaisu 105. Arvi A. Karisto Oy:n kirjapaino, Hämeenlinna, (1965).
58. Waite, R., The water-soluble carbohydrate of grasses. III. First and second year growth. *J. Sci. Food Agric.*, **1957**, *8*, 422-428.
59. Wylam, C.B., Analytical studies on the methods of grasses and clovers. III. Carbohydrates brakedown during wilting ensilage. *J. Sci. Food Agric.*, **1953**, *4*, 527-531.
60. Bidlack, J. E., Vaughan, J. E., Dewald, C. L., Forage quality of 10 Eastern gamagrass [*Tripsacum dasyloides* (L.) L.] genotypes, *J. Range Manage.*, **1999**, *52*, 661-665.
61. Faithfull, N.T., *Methods in Agricultural Chemistry Analysis: A Practical Handbook*, GABI Publishing, New York, USA, 2002, ss. 30 -34.
62. Simonne, A. H., Simonne, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A. ja Cresman, C. P. III, Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Food?, *J. Sci. Food Agric.*, **1997**, *73*, 39-45 .
63. CEM Corporation, Mars 5 mikroaaltouunin käyttöohje, (2009).
http://arf.berkeley.edu/webfm_send/396 (viitattu 18.08.2017).
64. Hoening, M., Preparation step in enviromental trace element analysis – facts and traps, *Talanta*, **2001**, *54*, 1021-1038.

65. Margui, E., Queralt, I., Carvalho, M.L. ja Hidakgo, M., Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 549 (1-2), 197-204.
66. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*; 9. painos, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 2010, a) ss. 394-407 b) 446-486 c) 565-589.
67. Hou, X. ja Jones, B.T., Inductively Coupled Plasma / Optical Emission Spectrometry. Kirjassa: Mayers R.a. (toim.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Winston-Salem, USA, 2000, ss. 9468-9485.
68. Lichte, F. E. ja Koirtzmann, S. R., *Induction Coupled Plasma Emission from a Different Angle*, Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Society, Philadelphia, USA, 1976, s. 26.
69. Mermet, J.-M., Revitalization of the matrix effects in inductively plasma atomic emission spectrometry: the key role of the spray chamber, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 419-422.
70. Bennet, V. ja Lewis, T., *Outliers in Statistical Data*, 2. painos, John Wiley & Sons Limited, San Francisco, USA, 1984.
71. Mönch-Tegeder, M., Lemmer, A., Oechner, H. ja Jungbluth, T., Investigation of the methane potential of horse manure, *Agric.Eng. Int.*, **2013**, 15 (2), 161-171.
72. Mönch-Tegeder, M., Lemmer, A. ja Oechner, H., Enhancement of methane production with horse manure supplement and pretreatment in a full-scale biogas process, *Energy*, **2014**, 73, 523-530.
73. Kafle, G. K. ja Chen, L., Comparison on batch anaerobic digestion of five different livestock manure and prediction of biochemical methane potential (BMP) using different statistical models, *Was. Man.*, **2016**, 48, 492-502.
74. Ordakowski-Burk, A. L., Quinn, R. W., Shellem, T. A. ja Vough, I. R., Voluntary intake and digestibility of reed canarygrass and timothy hay fed to horses, *J. Animal Sci.*, **2006**, 84 (11), 3104-3109.
75. Watts, K.A., Forage and pasture management for laminitic horses, *Clin. Techn. Equine Pract.*, **2004**, 3, 88-95.
76. Palmgren Karlsson, C., Lindberg, M. ja Rundgren, M., Associative effects on total tract digestibility in horses fed different ratios of grass hay and whole oats, *Liv. Prod. Sci.*, **2000**, 65 (1-2), 143-153.

77. Lásztity, R., Oat grain – A wonderful reervoir of natural nutrients and biologically active substaces, *Food Rev. Int.*, **1998**, *14*, 99-119.
78. Chastain, J. P. ja Moore, K. P., Plant Nutrient and CarbonContent of Equine Manure as influenced by Stall Management in South Carolina, *Annual Int. Meeting*, Montreal, Canada, 13.-16.7.2014, ss. 1-12.

Taustamäärityslaskutoimitukset**LIITE 1**

Kuiva-aineen pitoisuusprosentti jokaiselle näytteelle erikseen:

Säilöheinä SH1

$$\begin{aligned} \text{Kuiva - ainepitoisuus (\%)} &= \frac{m(\text{kuivattu näyte ja astia}) - m(\text{astia})}{m(\text{punnittu näyte})} \cdot 100 \% \\ &= \frac{44,2595 \text{ g} - 43,316 \text{ g}}{1,0022 \text{ g}} \cdot 100 \% = 94,143 \% \end{aligned}$$

Tuhkapitoisuus, g/kg ka:

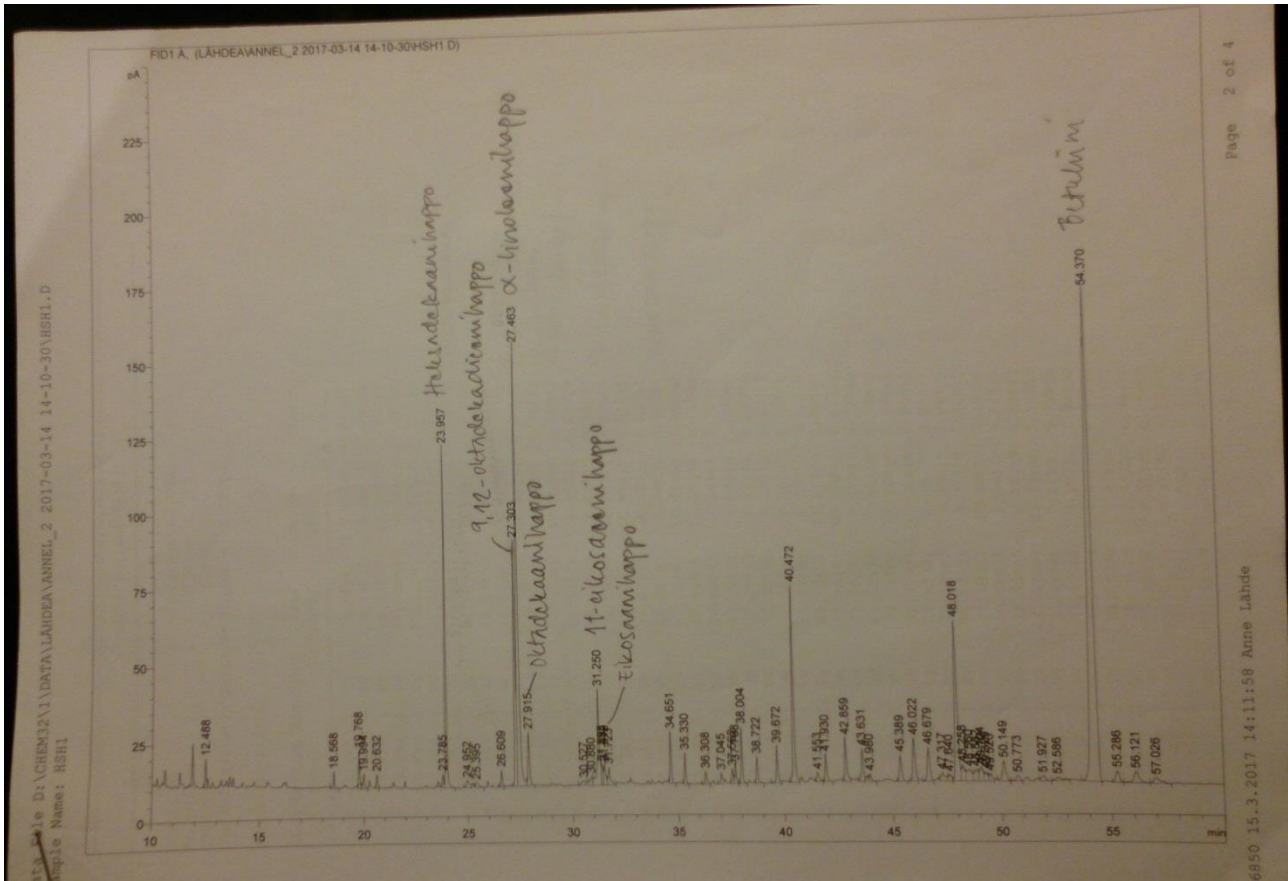
Säilöheinä SH1

$$\begin{aligned} \text{Tuhkapitoisuus} &= \frac{m(\text{tuhkistettu näyte ja astia}) - m(\text{astia})}{m(\text{punnittu näyte})} \cdot 1000 \\ &= \frac{92,2958 \text{ g} - 90,6132 \text{ g}}{30,0796 \text{ g}} \cdot 1000 = 55,938 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} \end{aligned}$$

Orgaanisen aineksen määrä, g/kg ka:

Säilöheinä SH1

$$m(\text{org. aines}) = m(\text{näyte}) - m(\text{tuhka}) = 1000 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} - 55,938 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} = 944,062 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka}$$



Kuva 19. Kromatogrammi: rasvahapot säilöheinän rinnakkaisnäytteessä 1.

Intensiteettivasteet kromatogrammista (Kuva 19). Säilöheinä SH1, betulinoli 100,05 µg, näytetilavuus 2 ml.

	m(bet.)	V(näyte)	int.(r.h)	int.(bet.)
PALMITIINIHAPPO	100,05	2	479,6839	2227,75
LINOLIHAPPO	100,05	2	402,7079	2227,75
α-LINOLEENIHAPPO	100,05	2	903,9742	2227,75
STEARIINIHAPPO	100,05	2	100,9301	2227,75
EIKOSAEENIHAPPO	100,05	2	230,5084	2227,75
ARAKIDIINIHAPPO	100,05	2	47,59797	2227,75

SH1: heksadekaanihappo

$$c(\text{rasvahappo}) = \frac{m(\text{bet.}) \cdot \text{int}(\text{rh})}{V(\text{näyte}) \cdot \text{int}(\text{bet.})} = \frac{100,05 \mu\text{g} \cdot 479,6839}{2 \text{ ml} \cdot 2227,75} = 10,77149 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 10,77 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

Näytettä punnittu 170,23 g, josta kuiva-ainetta 94,143 % → kuiva-ainetta 1,602595 g, laimennos 0,05 l

$$\begin{aligned} m(\text{rasvahappo}) &= \frac{V(\text{laimennos}) \cdot c(\text{rh})}{m(\text{kuiva näyte})} = \frac{0,05 \text{ l} \cdot 10,77149 \frac{\text{mg}}{\text{l}}}{1,602595 \text{ g}} = 0,33606 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ ka} \\ &= 0,336 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} \end{aligned}$$

Keskiarvo ja standardipoikkeama laskettiin teoriaosassa esitetyillä kaavoilla 3 ja 4.

Keskiarvo, kaksi rinnakkaisnäytettä: SH2 = 0,344988 g kg⁻¹ ka

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i}{n} = \frac{0,33606 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka} - 0,34498 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka}}{2} = 0,340519 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka}$$

Standardipoikkeama SH: rasvahappo

$$\begin{aligned} s &= \sqrt{\frac{\sum_i (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\left(0,33606 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka} - 0,340519 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka}\right)^2 + \left(0,34498 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka} - 0,340519 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka}\right)^2}{2 - 1}} \\ &= 0,00631 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka} \end{aligned}$$

Säilöheinän rasvahappokoostumus:

Rh, g/kg ka	Keskiarvo
Palmitiinihappo	0,340519
Linolihappo	0,289181
α-linoleeni-happo	0,653108
Steariinihappo	0,064082
Eikosaeenihappo	0,141744
Arakidiinihappo	0,032391
YHTEENSÄ	1,521025

Liukoiset sokerit laskettiin samalla tavalla.

Liukenematon ligniini, SH1

Näytteet heksaaniuuteainevapaista näytteistä, määritettiin kuiva-ainepitoisuus kuten edellä.

$$m(\text{Liukenematon lign}) = \frac{m(\text{näytejäännö ja sintteri}) - m(\text{sintteri})}{m(\text{punnittu kuivanäyte})} \cdot 1000 =$$

$$\frac{40,0007\text{g} - 39,9488\text{g}}{0,240368\text{g}} \cdot 1000 = 215,91892 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka}$$

Edellinen massa sisältää tuhkan, joten vähennetään se. Tulokseksi tulee 159,9807 g/kg ka.

Kahden rinnakkaisen säilöheinänäytteen keskiarvo sekä standardipoikkeama lasketaan kuten rasvahappoesimerkissä.

Happoon liukeneva ligniini (ADL), SH1

Laskettiin näytteestä mitattujen absorbanssien A avulla kaavalla

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

jossa on ε on molaarinen absorptiviteetti ja l kyvetin leveys ja c konsentraatio näytteessä.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \cdot V(\text{laimennos}) = \frac{0,42033 \cdot 20}{110 \frac{\text{l}}{\text{g} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm} \cdot 5} = 0,015383 \frac{\text{g}}{\text{l}}$$

Näyte laimennettiin anioninvaihdon ja suodatuksen jälkeen 500 ml:n (0,5 l) tilavuuteen.

$$\text{Pitoisuus(ADL, SH1)} = \frac{c(\text{näytteessä}) \cdot V(\text{näytetil.}) \cdot 1000 \text{ g}}{m(\text{punnittu näyte kuivaaine})} = \frac{0,015383 \cdot 0,5 \text{ l} \cdot 1000 \text{ g}}{0,240368 \text{ g}}$$

RESPONSE OF THE MONOSACCHARIDES

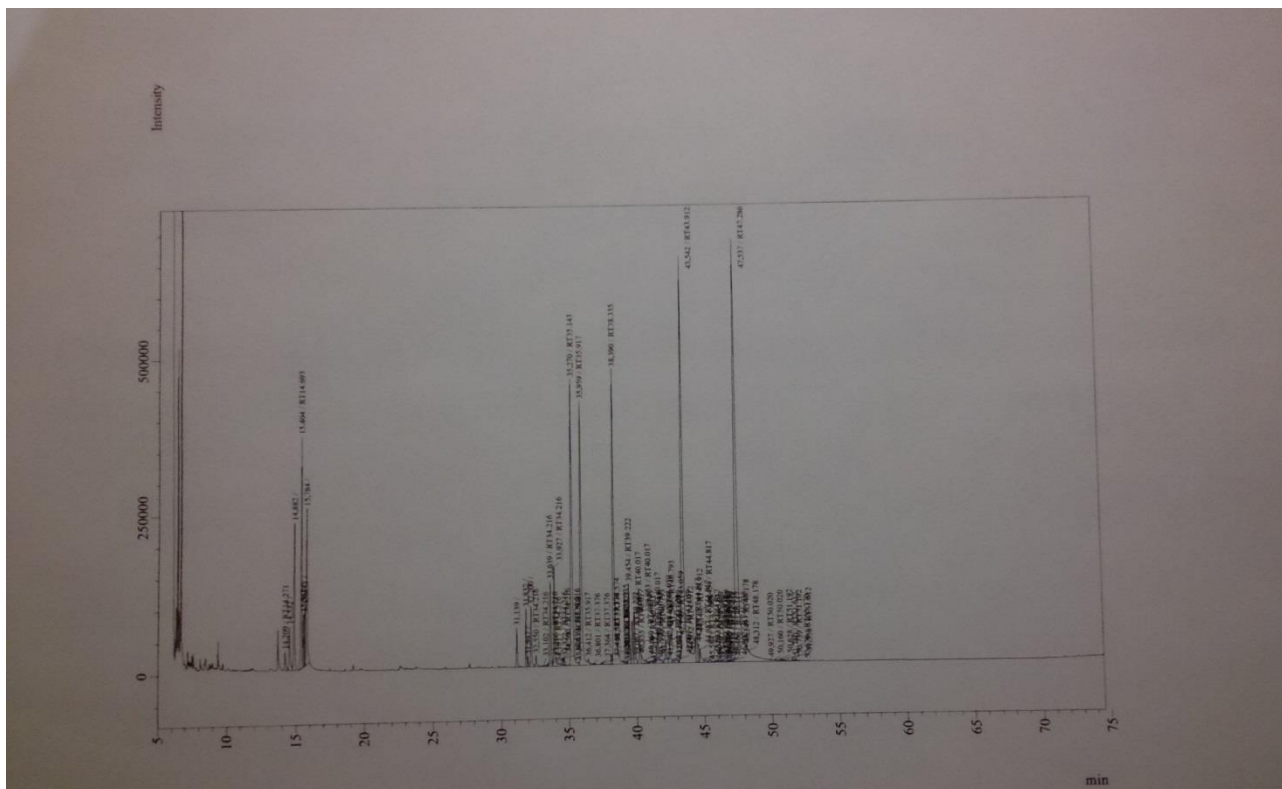
STD I

		V (µl)	c (mg/l)	m (µg)	Area
Internal standard	xylitol	1000	0,251	251	5333700
Standards	arabinose	500	0,514	257	
	galactose	500	0,5028	251,4	
	glucose	500	0,514	257,1	
	mannose	500	0,5092	254,6	
	xylose	500	0,5122	256,1	

	RT	Area	Ratio (%)
ARABINOSE		947235	21,2
$F=(F5/F4) \times (G4/F18)$		1166057	26,1
1,221533		1947191	43,6
		201873	4,5
		208417	4,7
Yht.		4470773	
GALACTOSE		451401	8,5
$F=(F6/F4) \times (G4/F24)$		1292022	24,5
1,011826		46087	0,9
		3490253	66,1
Yht.		5279763	
GLUCOSE		78224	1,8
$F=(F7/F4) \times (G4/F30)$		1773746	39,9
1,229169		2592759	58,3
Yht.		4444729	
MANNOSE		3080799	71,0
$F=(F8/F4) \times (G4/F36)$		1260781	29,0
1,246136			
Yht.		4341580	
XYLOSE		296156	5,7
$F=(F9/F4) \times (G4/F45)$		113705	2,2
1,040268		604236	11,6
		1981585	37,9
		2235732	42,7
Yht.		5231414	

Kuva 21. Monosakkaridien responssikertoimet.

Näytteen SH1 kromatogrammi on esitetty kuvassa 22.



Kuva 22. Kromatogrammi SH1-näytteestä.

SH1 sisältämät monosakkaridit ja niiden pitoisuudet:

Kuvassa 23 on esitettyinä monosakkaridien pitoisuuslasku näytteelle SH1.

Monosakkaridien intensiteettivasteiden pinta-alat (Kuva 22) kohdassa pinta-ala (Kuva 23).

MONOSAKKARIDIEN PITOISUUS

SH1

RESPONSSIKERTOIMET:		KSYLITO LI
ARABINOOSI	1,22	0,251 mg
I	2	
GALAKTOOSI	1,01	
SI	2	
	1,22	
GLUKOOSI	9	
	1,24	
MANNOOSI	6	
	1,04	
KSYLOOSI	0	

Näyte:
 Kolonni: DP-1701, 60 m
 Info:
 Näytemäärä: 4,7807 mg neutralized

Oletus RT	RT	Yhdiste	Pinta-ala	Suhde	Määrä % [mg/mg]	Määrä [%] monosakkarideista
40,6		Xylitol	3509525			0,1
36,02		Arabinose	335416	20		
36,87		Arabinose	439257	27		
38,96		Arabinose	757126	46		
39,91		Arabinose	68111	4		
40,21		Arabinose	52019	3		
		ARABINOS E	1651929	100		0,03 6,14
46,69		Galactose	129977	22		
49,17		Galactose	272768	47		
52,21		Galactose	6161	1		
53,03		Galactose	171897	30		
		GALACTOS E	580803	100		0,01 1,79
48,29		Glucose	399265	2		
50,96		Glucose	6884990	42		
59,15		Glucose	9138963	56		
		GLUCOSE	16423218	100		0,30 61,47
45,73		Mannose	458445	49		
52,63		Mannose	486342	51		
		MANNOSE	944787	100		0,02 3,58

37,3	Xylose	504942	6		
37,65	Xylose	135515	2		
39,42	Xylose	883109	10		
41,56	Xylose	3213039	38		
44,36	Xylose	3790098	44		
	XYLOSE	8526703	100	0,13	27,01
YHTEENSÄ		28127440		49,13	100,00

Kuva 23. Monosakkaridoen pitoisuudet näytteessä SH1.

Monosakkaridipitoisuudet, mg/mg

	SH1
Arabinoosi	0,03
Galaktoosi	0,01
Glukoosi	0,3
Mannoosi	0,02
Ksyloosi	0,13
Yht:	0,4913

Yksiköön g/kg ka kertaa 1000

	SH1
Arabinoosi	30
Galaktoosi	10
Glukoosi	300
Mannoosi	20
Ksyloosi	130
Yht:	491,3

Hemiselluloosa ja selluloosa

Polymeerina, kerroin: Arabinoosi 0,88; galaktoosi 0,9; glukoosi 0,9; Mannoosi 0,9 ja ksyloosi 0,88.

Glukoosia polysakkaridina: SH1

$$\text{Polysakkaridina} = 300 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} \cdot 0,9 = 270 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka}$$

polymeereinä	g kg ⁻¹ ka
	SH1
0,88	26,4
0,9	9
0,9	270
0,9	18
0,88	114,4

Selluloosa sisältää vain glukoosia, joten säilöheinänäyte sisältää selluloosaa 270 g kg⁻¹ ka. Hemiselluloosa sisältää muita polysakkarideja, joten säilöheinä sisältää hemiselluloosaa 167,8 g kg⁻¹ ka.

Selluloosalle ja hemiselluloosalle laskettiin keskiarvot näytteissä. Rehunäytteitä oli 2 rinnakkaista ja lantanäytteitä 6 rinnakkaista näytettä. Lisäksi selluloosalle ja hemiselluloosalle laskettiin standardipoikkeama ja luottamusraja 95 % kuten rasvahappokoostumuksessa.

NDF ja ADF, SH1

NDF sisältää hemiselluloosan, selluloosan, liukoisen ligniinin ja liukenemattoman ligniinin.

$$NDF(SH1) = 167,8 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} + 270 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} + 31,9989 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} + 215,91892 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} = 629,7796 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka}$$

ADF sisältää selluloosan, liukoisen ligniinin ja liukenemattoman ligniinin.

$$ADF(SH1) = 270 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} + 31,9989 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} + 215,91892 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka} = 461,9796 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ka}$$

Jokaiselle näytteelle laskettiin keskiarvo molemmille kuiturakenteita kuvaavalle suurelle.

Raakaproteiinipitoisuuslaskutoimitukset**LIITE 4**

Titrantin kulutus (SH1) 7,45 ml, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mmol/ml}$

Punnittu näyte(SH1) = 1,0038 g

$M(\text{typpi}) = 14,007 \text{ mg /mmol}$

$V(\text{nolla}) = 0,10 \text{ ml}$

Typen massan määrittäminen: SH1

$$\begin{aligned} m(N) &= M(N) \cdot c(\text{HCl}) \cdot (V(\text{näyte}) - V(\text{nolla})) = 14,007 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \cdot 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \cdot (7,45 - 0,10) \text{ml} \\ &= 10,295145 \text{ mg} \end{aligned}$$

Typen pitoisuus näytteessä: SH1

$m(\text{punnittu näyte}) = 1,0038 \text{ g}$, kuiva-ainetta 0,941429

$$\begin{aligned} \text{pitoisuus (SH1)} &= \frac{m(N)}{m(\text{punnittu näyte}) \cdot \text{kuiva-aine}} = \frac{10,295145 \text{ mg}}{1,0038 \text{ g} \cdot 0,941429} \\ &= 10,89426 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ ka} \end{aligned}$$

Raakaproteiinipitoisuus kerroin 6,25

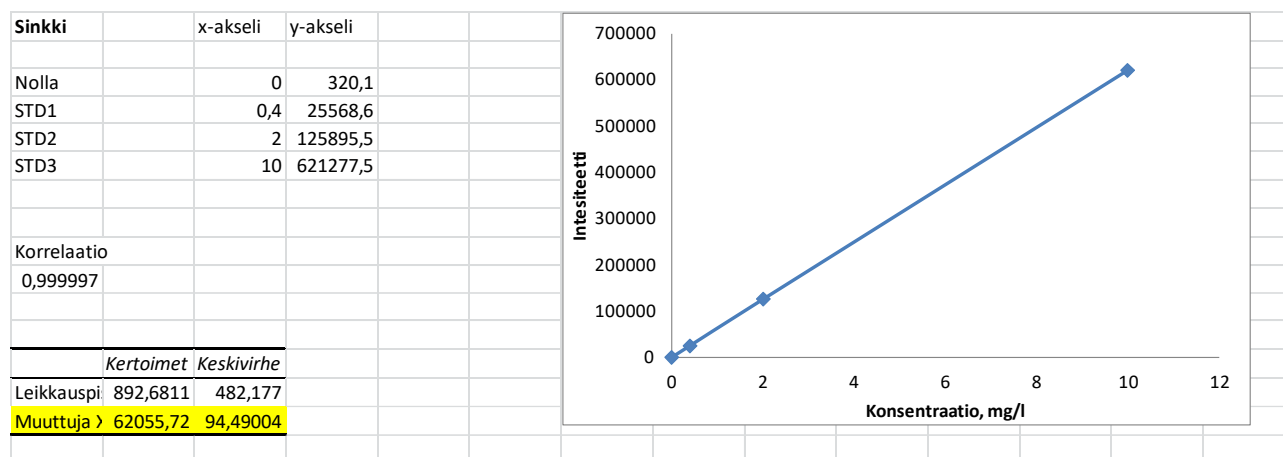
$$\begin{aligned} \text{Raakaproteiini pitoisuus} &= \text{pitoisuus (SH1)} \cdot 6,25 \\ &= 10,89426 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} \cdot 6,25 = 68,08912 \frac{\text{g}}{\text{kg}} \text{ ka} \end{aligned}$$

Keskiarvo laskettiin kahden rinnakkaisnäytteen perusteella sekä standardipoikkeama kuten rasvahappokoostumuksessa.

Mineraalit: Kalibrointi-, LOD- ja LOQ- sekä pitoisuuslaskutoimitukset LIITE 5

Kalibrointisuoran kulmakerroin ja standardipoikkeama:

Esimerkkinä ensimmäisen (kahdesta) mittauskerran (SH, K ja SH-lanta) **sinkki**



LOD ja LOQ laskut sinkille

$$LOD = \frac{3s_b}{b} = \frac{3 \cdot 94,49004}{62055,72} = 0,004568$$

$$LOQ = \frac{10s_b}{b} = \frac{10 \cdot 94,49004}{62055,72} = 0,015227$$

Mineraalit: näytteiden pitoisuudet kuiva-aineessa

c (SH1, pitoisuus, Zn) = 1,229 mg/l

V (näyte) = 0,050 l

Punnittu näyte (SH1) = 0,2010 g, tuhkaa 0,022617

Pitoisuuteen mg kg⁻¹ ka

$$pitoisuus = \frac{c \cdot V}{\text{Näyte}} = \frac{1,229 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot 0,050 \text{ l}}{\frac{0,2010}{0,022617 \cdot 1000} \text{ kg ka}} = 6,914501 \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ ka}$$

Laskettiin SH:n rinnakkaisten näytteiden (3 kpl) keskiarvo ja standardipoikkeamat kuten rasvahappokoostumuksessa.

