

52

*Helmi Mikkonen  
Marita Puikkonen  
Erkki Joki-Tokola  
Liisa Myllykoski*

**Heran fermentointi-  
tuotteiden soveltuvuus  
rehun säilöntäaineiksi**



*Helmi Mikkonen, Marita Puikkonen,  
Erkki Joki-Tokola ja Liisa Myllykoski*

---

# **Heran fermentointituotteiden soveltu- vuus rehun säilöntäaineiksi**

**Whey-based fermentation products as feed preservatives**

---

**Maatalouden tutkimuskeskus**

ISBN 951-729-539-1

ISSN 1238-9935

*Copyright*

Maatalouden tutkimuskeskus

Helmi Mikkonen, Marita Puikkonen, Erkki Joki-Tokola ja Liisa Myllykoski

*Julkaisija*

Maatalouden tutkimuskeskus, 31600 Jokioinen

*Jakelu ja myynti*

Maatalouden tutkimuskeskus, tietopalveluyksikkö, 31600 Jokioinen

Puh. (03) 4188 2327, telekopio (03) 4188 2339

*Painatus*

Vammalan Kirjapaino Oy, 1999

Sisäsivujen painopaperille on myönnetty pohjoismainen joutsenmerkki.

Kansimateriaali on 75-prosenttisesti uusiokuitua.

---

Mikkonen, H.<sup>1)</sup>, Puikkonen, M.<sup>1)</sup>, Joki-Tokola, E.<sup>2)</sup> & Myllykoski, L.<sup>1)</sup> 1999. Heran fermentointituotteiden soveltuvuus rehun säilöntäaineiksi. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 52. Jokioinen: Maatalouden tutkimuskeskus. 20 p + 1 app. ISSN 1238-9935, ISBN 951-729-539-1.

<sup>1)</sup> Oulun yliopisto, Prosessitekniiikan osasto, PL 4300, 90401 Oulu, [helmi.mikkonen@oulu.fi](mailto:helmi.mikkonen@oulu.fi), [marita.puikkonen@oulu.fi](mailto:marita.puikkonen@oulu.fi), [liisa.myllykoski@oulu.fi](mailto:liisa.myllykoski@oulu.fi)

<sup>2)</sup> Maatalouden tutkimuskeskus, Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasemantie 15, 92400 Ruukki, [erkki.joki-tokola@mtt.fi](mailto:erkki.joki-tokola@mtt.fi)

---

# Tiivistelmä

---

*Avainsanat: etikkahappo, Lactobacillus delbrueckii, maitohappo, murskevilja, nurmirehu, Propionibacterium freudenreichii, propionihappo, säilörehu*

---

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää herapohjainen säilöntäaine nurmirehulle ja tuoreena säilöttävälle rehuviljalle. Tuote valmistettiin fermentoimalla heraa panostoisesti *Lactobacillus delbrueckii*- ja *Propionibacterium freudenreichii*-bakteerikantojen avulla maito-, propioni- ja etikkahapoiksi. Fermentointituote sisälsi 43–51 % maitohappoa, 2–6 % etikkahappoa ja alle 1 % propionihappoa. Fermentointituotteen I teoreettinen säilöntävaikutus perustui näiden happojen suoloihin eli pääasiassa laktaatin ja asetaatin yhteisvaikutukseen. Säilöntävaikutus testattiin lisäämällä eri määriä fermentointituotetta I ensimmäisestä niitosta korjatun timoteinurmirehun (*Plenum*

*prantense*) säilöntäaineeksi. Fermentointituotteella I säilöttyjen koerehujen säilönällinen laatu jäi kuitenkin muurahaishapolla säilöttyä vertailurehua heikommaksi. Murskatun ohrarehuviljan säilönnässä käytetyn fermentointituotteen II säilöntävaikutus perustui ensisijaisesti vapaaseen maitohappoon. Rehuviljaa säilöttiin myös pelkällä heralla, jolloin säilöntä perustui laktoosin stimuloimaan maitohappokäymiseen. Vertailusäilöntäaineena käytetyn muurahaishapon ja fermentointituotteen II säilöntävaikutusten välillä ei ollut merkittävää eroa. Rehuvilja säilyi hyvin myös ilman säilöntäainelisäystä.

---

**Mikkonen, H.<sup>1)</sup>, Puikkonen, M.<sup>1)</sup>, Joki-Tokola, E.<sup>2)</sup> & Myllykoski, L.<sup>1)</sup> 1999. Whey-based fermentation products as feed preservatives. Publications of Agricultural Research Centre of Finland. Serie A 52. Jokioinen: Agricultural Research Centre of Finland. 20 p + 1 app. ISSN 1238-9935, ISBN 951-729-539-1.**

<sup>1)</sup> University of Oulu, Department of Process Engineering, PL 4300, FIN-90401 Oulu, Finland, helmi.mikkonen@oulu.fi, marita.puikkonen@oulu.fi, liisa.myllykoski@oulu.fi

<sup>2)</sup> Agricultural Research Center of Finland, North Ostrobothnia Research Station, Tutkimusase-  
mantie 15, FIN-92400 Ruukki, Finland, erkki.joki-tokola@mtt.fi

---

## Abstract

---

*Key words: acetic acid, ensilage, grass, high moisture grain, Lactobacillus delbrueckii, lactic acid, Propionibacterium freudenreichii, propionic acid*

---

The aim of this research was to produce whey based preservatives for ensiling grass and high moisture barley grain. The lactose in whey was fermented to lactic, acetic and propionic acids in a batch process with *Lactobacillus delbrueckii* and *Propionibacterium freudenreichii*. The fermentation product was concentrated to a content of 43–51% of lactic acid, 2–6% of acetic acid and less than 1% of propionic acid. The theoretical preservative action of fermentation product I was based on the combined effect of salts of these acids, mainly lactate and acetate. In the preservation experiment, fermentation product I was applied at various doses as a preservative when the first cut timothy

(*Pleum prantense*) was ensilaged. The fermentation quality of subsequent silages was, however, poorer than that of controls ensilaged with formic acid. High moisture grains were first rolled and then ensilaged with fermentation product II, the preservative action of which was mainly based on free lactic acid. Fresh whey was also used as a preservative and its preservative action was based on lactic acid fermentation stimulated by lactose. There was no difference in fermentation quality between grains ensilaged with formic acid as control treatment and fermentation product II. The fermentation quality of grains ensilaged with no additive was also good.

# Alkusanat

Oulun yliopiston prosessitekniikan osastolla on vuodesta 1995 alkaen toteutettu heran jatkojalostushanketta, jonka ovat rahoittaneet Kainuun Meijeri, Sotkamo, JK Juusto Kaira Oy, Kuusamo, Kyrönmaan Osuusmeijeri, Isokyrö, Laaksojen Maitokunta, Ylivieska, Limingan Osuusmeijeri, Liminka ja Osuuskunta Maitokolmio, Toholampi sekä maa- ja metsätalousministeriö. Hankkeen tavoitteena on kehittää maitoherapohjaisille raaka-aineille ja niiden prosessoinnissa syntyville sivujakeille uudenlaisia jatkojalostusprosesseja ja sopivia käyttökohteita. Hera koetaan yleensä juustonvalmistuksen vähäarvoiseksi sivutuotteeksi, koska sen taloudellinen arvo on vähäinen juustoon verrattuna ja se aiheuttaa ympäristöongelmia korkean biologisen haponkulutuksensa eli BOD-arvonsa vuoksi.

Heraa syntyy Suomessa vuosittain noin 900 miljoonaa kiloa. Sen suurimmat käyttökohdet ovat eläinrehujen valmistus ja elintarviketeollisuus, lähinnä leipomoteollisuus. Monipuolisen koostumuksensa ansiosta hera soveltuu myös fermentointiteollisuuden raaka-aineeksi. Tässä tutkimuksessa herasta pyrittiin fermentoimaan happoseos, joka soveltuisi rehujen säilöntään. Tutkimus suoritettiin yhteistyönä Maatalouden tutkimuskeskuksen Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman kanssa. Säilöntäaine valmistettiin Oulun yliopiston prosessitekniikan osastolla. Fermentoinnista vastasi FM Marita Puikkonen ja tutkimustulosten koamisesta ETM Helmi Mikkonen. Säilöntäkokeista vastasi Maatalouden tutkimuskeskuksen Pohjois-Pohjanmaan tutkimusaseman tutkija MMM Erkki Joki-Tokola.

*Liisa Myllykoski*  
Projektipäällikkö

# Sisällys

Tiivistelmä . . . . .	3
Alkusanat . . . . .	5
1 Johdanto . . . . .	7
2 Aineisto ja menetelmät . . . . .	8
2.1 Säilöntäaineiden valmistus . . . . .	8
2.2 Nurmisäilörehun ja tuoreviljan koesäilönnät . . . . .	9
3 Tulokset ja niiden tarkastelu . . . . .	11
3.1 Heran esikäsittely ja fermentointi . . . . .	11
3.2 Fermentointiliemen jälkikäsittely . . . . .	14
3.3 Nurmirehun säilöntä . . . . .	15
3.4 Rehuviljan säilöntä . . . . .	17
4 Yhteenveto . . . . .	19
Kirjallisuus . . . . .	19



# 1 Johdanto

Nurmirehun säilöntä ja tuoreen viljan murskesäilöntä perustuvat rehuvaraston ilmatiiviyteen ja rehun happamuuteen. Hiivat ja homeet tarvitsevat kasvaakseen happea, mutta happamuus ei estä niiden lisääntymistä. Rehua pilaavat hapettomissa oloissa menestyvät anaerobiset bakteerit viihtyvät parhaiten neutraalissa tai lievästi happamassa ympäristössä. Säilönnän yhteydessä lisätty happosäilöntäaine laskee nopeasti rehun happamuutta. Rehun omien sokereiden osittainen käyminen eli fermentoituminen maitohapoksi täydentää ja varmistaa happamuuden säilymisen rehussa. Murskesäilötyn viljan pH laskee pienemmän happomäärän avulla kuin nurmisäilörehun pH, koska viljan puskurikapasiteetti on pienempi. Rehuviljan säilönnässä voidaan käyttää säilöntäaineena happojen sijasta myös erilaisia sokeripitoisia tuotteita kuten heraa tai melassia. Niiden vaikutus perustuu maitohappokäymisen stimuloimiseen.

Maitohapon säilönnällinen vaikutus perustuu pääasiassa vapaan maitohapon määrään eikä niinkään pH-arvoon (Ye et al. 1996). Orgaaniset hapot voivat vapaassa muodossaan kulkeutua ravinteiden tavoin bakteerisolujen solukalvon läpi neutraaliin solulimaan, missä ne dissosioituvat ioneiksi ja protoneiksi. Solun on eritettävä protonit ulos solunsisäisen neutraalin pH:n ylläpitämiseksi, mikä kuluttaa energiaa (ATP) solun muiden elintärkeiden toimintojen kustannuksella (Lee & Wong 1993). Maitohappo ja muurahaishappo vastaavat säilönnällisiltä ominaisuuksiltaan toisiaan, koska yhden happomoolin ionisoituminen tuottaa rehuun yhden protonin. Molemmat hapot pyrkivät puskuroimaan liuoksen pH-arvoon 3,75 – 4,00, koska niillä on lähes sama happovakioarvo. Happovakiota vastaavassa pH-arvossa puolet heikoista hapoista on suolana ja puolet vapaana happona. Happovakiota alemmassa pH:ssa vapaan hapon osuus kasvaa, kun taas happovakiota korkeammassa pH:ssa suolojen osuus kasvaa. Maitohappoa on lisättävä ainemääränä kak-

sinkertainen annos muurahaishappoon verrattuna, koska maitohapon molekyylipaino on kaksinkertainen. Helpommin haihtuvana happona muurahaishappo voi levittyä rehuun maitohappoa tasaisemmin, mutta samasta syystä muurahaishapon hävikki rehusta voi olla maitohappoa suurempi. Molemmat hapot inhiboivat voi- ja etikkahappoa tuottavia bakteereita ja vähentävät rehun lämpenemisessä syntyvää ravinnehävikkiä, mutta homeita vastaan ne eivät ole kovin tehokkaita. Maitohappo ei estä hiivojen tai homeiden kasvua edes pH-tasolla 3. Propionihappo inhiboi homeiden ja etikkahappo hiivojen kasvua. Propioni- ja etikkahappojen pK-arvot ovat 4,9 ja 4,8, joten ne pyrkivät puskuroimaan liuoksen lähelle pH-arvoa 5. Tämä happamuus ei estä rehun virheikäymisiä, kuten voihappokäymistä (Ali-Yrkkö 1983). Maitohapon avulla voidaan kuitenkin lisätä rehun happamuutta. Samalla lisääntyy propioni- ja etikkahappojen inhibiatiovaikutus, koska tällöin valtaosa propioni- ja etikkahapoista on vapaana happona (Helander et al. 1997, Mäki 1997). Propionihapon annostelutaso vaikuttaa kuitenkin oleellisesti saavutettuun lopputulokseen, sillä laimeina pitoisuuksina propionihapon vaikutus on kasvua estävä (biostaattinen) ja korkeampina pitoisuuksina tappava (biosidinen) (Huitson 1968).

Orgaanisten happojen inhibiatiovaikutus on 10 – 600 kertaa voimakkaampi vapaina happoina kuin happojen suoloina (Helander et al. 1997). Happojen suolojen vaikutus on hitaampi eikä kestä yhtä pitkään kuin vapaiden happojen vaikutus, koska suolojen täytyy ensin hydrolysoitua vapaiksi hapoiksi. Hydrolysoituminen on käytännössä epätäydellistä ja hidasta rehujen säilöntäolosuhteissa (kosteus n. 15 % ja pH 4 – 6) (Kohler 1993). Lisäksi tähän kuluu rehun luontaisessa maitohappokäymisessä syntyvää maitohappoa kasviaineksen hapattamisen ohella. Happojen suolat lisäävät luontaista maitohappokäymistä, kun taas vapaat hapot vähentävät sitä (Moisio & Heikonen 1992, Peltonen 1993).

Hera soveltuu maito-, propioni- ja etikkahapposeoksen fermentointiin raaka-ai-

neeksi, koska pääosa (n. 70 %) sen kuiva-aineesta on hapatemikrobien hiilen ja energian lähteeksi sopivaa laktoosia. Lisäksi herassa on myös muita hapatemikrobien tarvitsemia ravintoaineita (proteiineja, kivennäis- ja hivenaineita sekä vitamiineja). Heran homofermentatiivisessa maitohappokäymisessä syntyy pääosin maitohappoa ja vain pieniä määriä (alle 20 %) etanolia, etikkahappoa, muurahaishappoa, hiilidioksidia ja muita sivutuotteita (Buchta 1983a). Optimaalisissa olosuhteissa *Lactobacillus delbrueckii* fermentoi koko sokerimäärän 1 – 2 vuorokaudessa, kun heran sokeripitoisuus on alussa noin 5 %. Maitohapon suolaa, laktaattia, syntyy 0,90 – 0,95 g/(g sokeria) (Blanch & Clark 1997, p. 614). Propionihappokäymisessä syntyy propionihapon ohella myös etikkahappoa ja hiilidioksidia. Maksimaalinen propionihapposaanto gluukoosista on 54,8 % ja etikkahapposaanto 22,2 % (Blanch & Clark 1997, p. 617).

Tässä tutkimuksessa herasta fermentoitiin maitohapon, propionihapon ja etikkahapon seosta. Fermentoinnissa syntyvä tuote oli lähinnä näiden happojen suolaliuosta, sillä vapaiden happojen osuus jäi pieneksi. Tämä tuote konsentroidiin fermentointituotteeksi I, jolla tehtiin timoteinurmirehun säilöntäkoke kesäkuussa 1997. Lisäksi fermentoinnissa syntyvä tuote hapotettiin

ja konsentroidiin fermentointituotteeksi II, jolla tehtiin ohrarehviljan säilöntäkoke saman vuoden elokuussa. Happojen suolaliuoksen sokeripitoisuus oli pieni, kun taas hapotetun tuotteen sokeripitoisuus oli korkea. Runsaasti sokereita sisältävän tuotteen otaksuttiin soveltuvan nurmirehua paremmin rehuviljalle, koska tuotteen levittäminen olisi ollut vaikeaa tuotteen suuren viskositeetin vuoksi. Rehuviljan säilönnässä tuotteen siirappimaisuus voi olla jopa eduksi, koska se pidättyy esim. heraa paremmin viljaan eikä valu yhtä helposti hukkaan.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Säilöntäaineiden valmistus

Herapohjaisen säilöntäaineen valmistusvaiheet on esitetty taulukossa 1. Käytetyt bakteerikannat olivat *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (LKT) ja *Propionibacterium freudenreichii* (ATCC 6207). Laktobasilleja säilytettiin Difcon Skim Milk -elatusaineen ja glyserolin seoksessa (8:1,5) pakasteena –20 °C:ssa. Viljely suoritettiin Skim Milkissä, johon oli lisätty 1 % bakteerikantaa, 32

**Taulukko 1.** Herapohjaisten säilöntäaineiden valmistus.

Konsentroitinti	Esikäsitely		Fermentointi		Jälkikäsitely		Tuote	
	Säilytys	Suodatus fermentoriin	Erä	Määrä l	Suodatus	Hapetus/Konsentroitinti	Erä	Määrä l
MF, UF	+	MF	1	10	MF, UF	-/+		
MF, UF	+	MF	2	10	MF, UF	-/+	I	5,4
MF, UF	+	MF	3	75	MF, UF	-/+		
-	+	MF	4	5	-	-/-	-	-
-	-	MF	5	75	MF, UF	+/+	II	1,2
						-/+	III	2,2
-	-	MF	6	75	MF, UF	-/+	IV	2,8

MF) Mikro-suodatus

UF) Ultra-suodatus

+) Tehty

-) Ei tehty

°C:ssa 1 – 2 vrk ennen fermentoriin siirrostusta. Propionihappobakteereita säilytettiin Difcon MRS -liemen ja glyserolin seoksessa (8:1,5) pakasteena –20 °C:ssa. Viljely suoritettiin MRS -liemessä, johon oli lisätty 10 % laktoosia (JK Juusto Kaira Oy, Kuusamo) ja 2 % bakteerikantaa, 32 °C:ssa 3 vrk ennen fermentoriin siirrostusta. Laktobasilleja ja propionihappobakteereita lisättiin kumpaakin 1 %:n siirros määrä fermentoriin.

Hera mikro- ja ultrasuodatettiin Pellicon-laitteistolla (PALL FILTRON CENTRASETTE™ MEMBRANE CASSETTES). Mikro-suodatuksessa käytettiin 0,5 µm:n kalvoja mikrobien ja rasvan poistoon ja ultrasuodatuksessa 8000 MWCO:n kalvoja proteiinien erottamiseen. Kasvualustojen sterilointiin käytettiin autoklavointia 120 °C:ssa 20 minuuttia.

Fermentointialustana käytettiin Limingan Osuusmeijerin mikro-suodatettua juustoheraa (proteiinipitoisuus 0,6 – 0,8 %) sellaisenaan tai ultrasuodatuksella väkevyitynä 1 %:n proteiinipitoisuuteen. Ennen fermentointia heraa säilytettiin pakasteessa –20 °C:ssa tai +4 °C:ssa. Fermentointi suoritettiin *L. delbrueckii* ja *P. freudenreichii* kaksikantahapanteella 5, 10 ja 75 l:n erissä. Olosuhteet olivat: 32 °C, 3 vrk, sekoitus 100 – 150 rpm, neutralointi 5, 9 M tai 7 M NaOH-syötöllä pH-arvoon 6 ensimmäisen vuorokauden ajan, jonka jälkeen fermentointia jatkettiin kaksi vuorokautta ilman neutralointia.

Osa fermentointiliemestä hapotettiin ioninvaihtotekniikalla käyttäen kationinvaihtohartsia (Finex, CS 24M (H+)). Kolonnissa (Pharmacia, sisähalkaisija 50 mm) käytetty hartsimäärä/kolonnin korkeus oli 700 g/45 cm ja 1296 g/85 cm, ja liuoksen virtausnopeus 3 – 5 l/h. Hapotetun liemen, pH < 4, saanto oli n. 7 ml/(g CS 24M), jonka jälkeen hartsi regeneroitiin 6 %:sella HCl-liuoksella.

Fermentointiliemi konsentroitiin n. 50 %:n maitohappopitoisuuteen pallohaiduttimella, Büchi Rotavapor R-153, johon oli yhdistetty Büchi Vacuum System B-

178. Haihdutusolosuhteet olivat: vesihäyteen lämpötila 60 °C, pyörimisnopeus 70 – 80 rpm, alipaine 70 mbar ja haihtuvan vesihöyryn lämpötila 42 °C.

Fermentointiliemen maitohappo-, etikkahappo- ja propionihappopitoisuudet sekä laktoosi-, glukoosi- ja galaktoosipitoisuudet määritettiin HPLC-laitteistolla (Merck Hitachi) käyttäen ioniekskluusiokolonnia (Coregel 87H, 300 mm x 7,8 mm, Organic acids Column, Inter Action). HPLC-menetelmä ilmoittaa vapaiden happojen ja happojen suolojen yhteismäärän ”happona”. Lisäksi fermentointituotteen happo- ja sokeripitoisuudet määritettiin laskennallisesti fermentointiliemen ja haihdutusveden pitoisuuksista kaavalla 1, sillä herassa, fermentointiliemessä ja tuotteissa on runsaasti orgaanisia yhdisteitä, jotka häiritsevät tätä määrittystä. Näistä häiriötekijöistä aiheutuvat virheet kertautuvat tuotteissa, joissa joudutaan käyttämään suuria laimennoksia. Kuiva-aine määritettiin 105 °C:ssa, kokonaisproteiinipitoisuus Lowry-menetelmällä ja pH standardivälillä pH 4,0 – 7,0.

Kaava 1.

$$c_2 = (c_1 V_1 - c_3 V_3) / V_2$$

$c_1$  on pitoisuus fermentointiliemessä, g/l

$c_2$  on pitoisuus tuotteessa, g/l

$c_3$  on pitoisuus haihtuneessa vedessä, g/l

$V_1$  on fermentointiliemen tilavuus, l

$V_2$  on tuotteen tilavuus, l

$V_3$  on haihtuneen veden tilavuus, l.

## 2.2 Nurmisäilörehun ja tuoreviljan koesäilönnät

Nurmirehun säilöntäkokeen koetekijöitä olivat rehun kuiva-ainepitoisuus (tuore *vs.* esikuivattu) ja rehuun lisätyn säilöntäaineen koostumus ja käyttömäärä. Tämän kokeen säilöntäaineita olivat muurahishappo ja herasta valmistettu säilöntäaine, fermentointituote I, jonka koostumus on esitetty taulukossa 2. Fermentointituotetta I lisättiin rehuun 15, 30, 45 ja 60 ml/kg. Annostelutaso 30 ml/(kg rehua) vastasi teoreettisesti säilöntävaikutukseltaan vertailusäilöntäaineena käytettyä muurahishap-

**Taulukko 2.** Fermentointituotteiden I (FT I) ja II (FT II) sekä heran koostumus.

Aineosat	FT I %	FT II %	Hera %
Sokerit yhteensä	1	41	4
Maitohappo	43	51	0,2
Propionihappo	< 1	< 1	-
Etikkahappo	6	2	-
Hapot yhteensä	49	53	-
Proteiinit	0,9	1,0	0,8
Kuiva-aine	60	60	6
pH	5,9	< 1	-

-) Ei mitattu

polisäystä 5 ml/(kg rehua). Fermentointituotteessa I maitohappo on kuitenkin pääasiassa laktaattina, joten kokeessa käytettiin myös suurempia annostelutasoja. Kokeen kontrollikäsitelyä oli painorehu, joka säilöttiin ilman säilöntäainetta. Koekäsitelyt toistettiin kolme kertaa ja yhden koejäsenen rehumäärä oli 5 kg. Koejärjestelyt on esitetty taulukossa 3.

Koerehujen säilöntä aloitettiin timoteivaltaisen säilörehunurmen kevätsadon niitomurskauksella 26.6.1997. Puolet niitetyistä rehualasta korjattiin välittömästi niiton jälkeen tuoreena ja loput viisi tuntia kestäneen esikuivauksen jälkeen tarkkuus-silppurilla rehukärriin. Molemmat rehut säilöttiin välittömästi korjuun jälkeen viiden kilon erissä ilmatiiviisiin muovipusseihin. Kokeessa käytetyt säilöntäaineet lisättiin rehuun käsin hyvin sekoittaen koerehujen säkityksen yhteydessä. Saman koekäsit-

telyn kaikki kolme kerranetta sijoitettiin samaan piensiiloon siten, että kolmas kerranne tuli aina siiloon pohjimmaisiksi ja ensimmäinen kerranne päällimmäisiksi. Muovista valmistettujen piensiilojen korkeus oli 500 mm ja halkaisija 250 mm. Siilot painotettiin hiekkapainoja käyttäen (200 kg/m<sup>2</sup>).

Säilörehuista otettiin kuuden kuukauden varastoinnin jälkeen edustavat rehunäytteet. Niistä määritettiin kuiva-aine (ka), raakavalkuainen ja raakakuitu sekä pH, maitohappo, etikkahappo, liukoinen tyyppi ja ammoniumtyppi Valion Pohjois-Suomen aluelaboratoriossa Haapavedellä. Määrittäminen tehtiin säilörehujen kemiallisen koostumuksen ja säilönnällisen laadun arviointiin kehitetyillä menetelmillä: raakavalkuainen ja -kuitu määritettiin NIR-menetelmällä ja maitohappo, etikkahappo, liukoinen tyyppi ja ammoniumtyppi titraamalla. Titraamalla ei voida määrittää erikseen maito- ja muurahaishapon pitoisuutta happojen toisiaan lähellä olevien happovakioiden takia, vaan näiden happojen yhteismäärä ilmoitetaan maitohappona. Myös kaikkien säilörehussa esiintyvien haihtuvien rasvahappojen (etikka-, propioni- ja voi-happojen) happovakiot ovat lähellä toisiaan. Näiden happojen pitoisuudet ilmoitetaan etikkahapoksi nimettynä. Haapavedelle toimittettujen näytteiden lisäksi kaikista koejäsenistä otettiin rinnakkaisnäytteet, joista määritettiin säilörehujen voi-happopitoisuus. Määrittäminen tehtiin säilörehujen puristuksesta Oulun yliopiston prosessiteknikan osastolla HPLC-menetelmällä (kolonnilla Coregel 87H, Inter Action).

**Taulukko 3.** Nurmirehujen säilöntäkokeen koejärjestelyt.

Säilöntäaine	Lisäys ml/kg	Tuorerehu Koejäsen (kerranne 1-3)	Esikuivattu rehu Koejäsen (kerranne 1-3)
Kontrolli	0	1	1
Muurahaishappo	5	2	2
Fermentointituote I	15	3	3
Fermentointituote I	30	4	4
Fermentointituote I	45	5	5
Fermentointituote I	60	6	6

Rehuviljan säilöntäkoetta varten viljaerä puitiin keltatuleentuneesta ohrakasvustosta, jossa puunituoreen jyvän kuiva-ainepitoisuus oli noin 52 %. Vilja murskattiin välittömästi puinnin jälkeen valssimyllyllä ja murskattu vilja säilöttiin viiden kilon erissä ilmatiiviisiin muovipusseihin. Säilöntäaine lisättiin käsin rehuun säkityksen yhteydessä. Kokeessa oli viisi säilöntäkäsittelyä, jotka toistettiin kolme kertaa. Rehuviljan koejärjestelyt on esitetty taulukossa 4. Fermentointituotteen II (Taulukko 2) lisäsmäärä 16 ml/kg vastasi teoreettiselta säilöntävaikutukseltaan kokeessa vertailuna käytettyä muurahaishappolisäystä 3 ml/kg. Fermentointituotteen II säilöntävaikutus perustui kuitenkin hapon ohella myös runsaaseen sokeripitoisuuteen. Kokeen viides koejäsen säilöttiin tuoreella juustoheralla. Heralisäys tuotti rehuun noin 2 kg sokeria/(1000 kg rehua). Sokerilisäys jäi vähäiseksi, sillä sen teoreettinen tarve olisi 4–5 kertaa suurempi. Käytännössä heraa ei kuitenkaan kannata lisätä enempää, koska se valuu helposti viljan läpi. Taulukossa 2 on esitetty rehuviljan säilönnässä käytetyn fermentoidun herapohjaisen säilöntäaineen (fermentointituote II) ja heran koostumus.

Murskesäilötystä rehuviljasta otettiin edustava rehunäyte kahdeksan kuukauden varastoinnin jälkeen. Rehunäytteistä määritettiin kemiallinen koostumus (kuiva-aine, raakavalkuainen ja -kuitu) standardimenetelmän MTT:n Lapin tutkimusasemalla. Rehuviljan säilönnällinen laatu, happo- ja sokeripitoisuudet, määritettiin Oulun yliopiston prosessiteknikan osastolla HPLC-menetelmällä. Maitohappo-, etikkahappo-,

**Taulukko 4.** Rehuviljan säilöntäkokeen koejärjestelyt.

Säilöntäaine	Lisäys ml/kg	Koejäsen (kerranne 1-3)
Kontrolli	0	1
Muurahaishappo	3	2
Fermentointituote II	8	3
Fermentointituote II	16	4
Hera	50	5

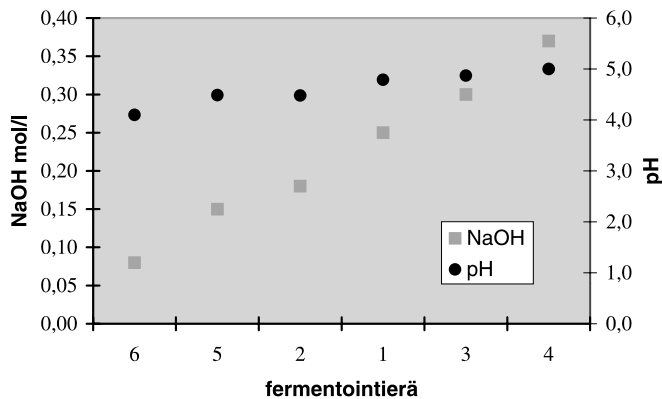
propionihappo-, muurahaishappo-, ja vohappopitoisuudet sekä laktoosi-, glukoosi- ja galaktoosipitoisuudet määritettiin kolonnilla Coregel 87H (Inter Action). Maito- ja muurahaishapon yhteismäärä ilmoitetaan tuloksissa maitohappona ja etikka-, propioni- ja vohappojen yhteismäärä etikkahappona.

## 3 Tulokset ja niiden tarkastelu

### 3.1 Heran esikäsittely ja fermentointi

Fermentoinnin tavoitteina olivat sekä mahdollisimman täydellinen laktoosin ja laktoosin hajoamistuotteiden galaktoosin ja glukoosin käyminen happoseokseksi (sokerien konversio) että fermentointiliemen mahdollisimman alhainen pH. Näihin tavoitteisiin pyrittiin rajatun neutralointiajan kautta. Fermentoinnissa syntyvää maitohappoa jouduttiin neutraloimaan tuoteinhibition vuoksi, jolloin tuote saatiin laktaattina. Fermentoinnissa pH säädettiin 6:een ensimmäisen vuorokauden aikana, jolloin valtaosan laktoosista odotettiin käyvän laktaatiksi homofermentatiivisen *L. delbrueckii* ansiosta. Tämän jälkeen fermentointia jatkettiin vielä kaksi vuorokautta ilman neutralointia, minkä aikana lopun sokerin odotettiin käyvän laktaatin ohella vapaaksi maitohapoksi ja pH:n laskevan mahdollisimman lähelle arvoa 4. Maitohappokäymisessä syntynyt laktaatti ja laktoosin hajoamistuotteet, glukoosi ja galaktoosi, toimivat propionihappokäymisen pääasiallisina lähtöaineina. Fermentointituotteessa tulisi olla propionihappoa teoreettisesti noin puolet maitohapon määrästä, jotta se tehoaisi rehunsäilönnässä bakteereita ja homeita vastaan.

Hera mikro-suodatettiin mikrobien ja rasvan poistamiseksi ja konsentroidiin n. 1 %:n proteiinipitoisuuteen ultrasuodatuksella erissä 1–3, jonka jälkeen hera edelleen

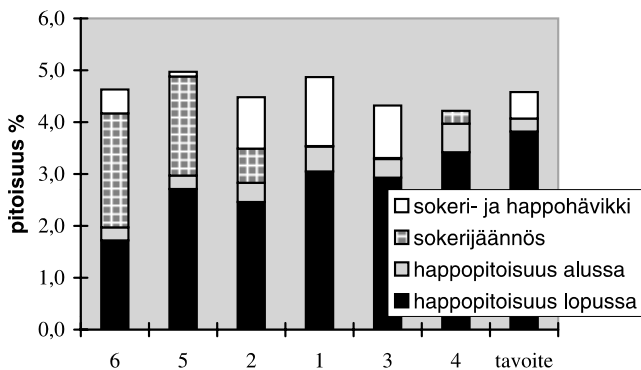


**Kuva 1.** NaOH-määrän vaikutus pH-arvoihin fermentoinnin lopussa. Heraa on fermentoitu *L.delbrueckii* ja *P.freudenreichii* kaksikantahapatteella 32 °C:ssa 3 vrk:n ajan.

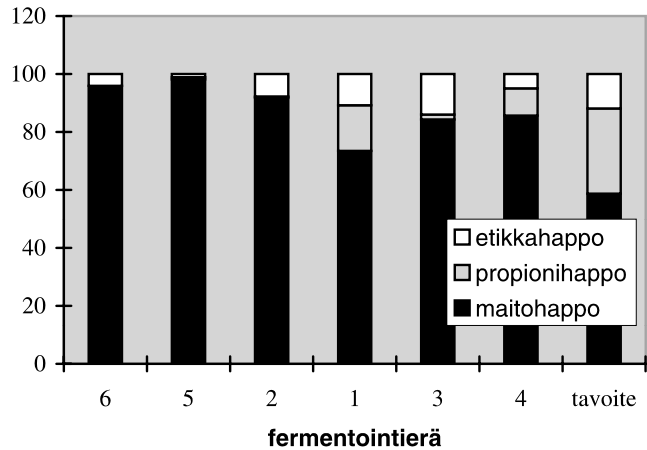
mikro-suodatettiin fermentoriin (Taulukko 1). Prosessin yksinkertaistamiseksi erässä 4 kokeiltiin fermentointia pelkästään mikro-suodatetussa herassa. Tässä erässä sokerijäännös oli pieni, happosaanto maksimaalinen eikä sokeri- ja happohävikkiä syntynyt lainkaan. Erän 4 hyvin tuloksiin vaikuttanee osaltaan pieni mittakaava sekä varastoinnin aikana herassa tapahtuneet mikro-bien ja entsyymien aiheuttamat muutokset. Tämän perusteella erissä 5 ja 6 hera mikro-suodatettiin fermentoriin ilman konsentroidintia. Näissä erissä sokerijäännös jäi kuitenkin suureksi verrattuna eriin 1 – 3, joissa mahdollisesti voimakkaamman bakteerikasvun myötä sokerijäännös jäi pieneksi. Erissä 1 – 3 sokerit fermentoituivat nopeasti hapoiksi ja toisaalta syntyi myös suurempi sokeri- ja happohävikki, koska näitä ravinteita kului enemmän bakteerisolujen kasvuun. Fermentointien kulku on esitetty liitteessä 1.

Heran sokereiden lähes täydellinen käyminen hapoiksi onnistui voimakkaan neutraloinnin ansiosta, jolloin pH oli lopussa noin 5. Kuvassa 1 on esitetty neutraloinnin vaikutus saavutettuihin pH-arvoihin eri fermentointierissä. Fermentointiliemen loppu-pH jäi sitä korkeammaksi, mitä enemmän NaOH:a oli lisätty neutraloinnin aikana.

Fermentointierien 1 – 6 sokerijäännökset sekä happosaannot on esitetty kuvassa 2. Sokerijäännös oli noin puolet alkupitoisuudesta, kun fermentoinnissa saavutettiin alhaisin pH-arvo 4,1. Happosaantoon ja sokerijäännökseen vaikuttaa eniten ensimmäisen vuorokauden eli neutraloinnin aikana tapahtuva laktoosin käyminen laktaattiksi. Sokereiden tulisi kulua tällöin lähes loppuun, koska neutraloinnin loputtua syntyvä vapaa maitohappo estää nopeasti sekä propionihappokäymisen että maitohappokäymisen. Tuotettujen happojen pitoisuussuhteet on esitetty kuvassa 3. Propionihap-



**Kuva 2.** Laktoosin fermentoituminen hapoiksi. Sokerijäännös koostuu laktoosista, galaktoosista ja glukoosista.



**Kuva 3.** Fermentoinnissa syntyneiden happojen pitoisuussuhteet.

posaanto oli noin 10 % fermentointierissä 1 ja 4, joissa sokereiden käyminen hapoiksi oli tehokkainta ensimmäisen vuorokauden aikana. Muissa erissä propionihapposaanto jäi 0 – 1 %:iin.

Fermentointitavoitteet olivat liian risti-riitaiset pyrittäessä toisaalta sokereiden täydelliseen käymiseen hapoiksi ja toisaalta alhaiseen pH-arvoon. Neutraloinnin rajaaminen ajan perusteella ei myöskään taannut kumpaakaan tavoitetta. Sokereiden käymisen kannalta riittävä neutralointi oli välttämätöntä, mutta toisaalta jo vähäinenkin neutralointi esti tavoiteena olleen pH-arvon 4,0 saavuttamisen. Käytännössä, kun saavutettiin lähes täydellinen sokereiden käyminen hapoiksi, fermentointiliemen pH laski hitaasti mahdollistaen myös happoherkemmän propionihappokäymisen. Loppu-pH jäi kuitenkin tällöin lähelle 5:ttä. Toisaalta alhaisimmalla saavutetulla loppu-pH-arvolla 4,1 jäännösokerin osuus oli puolet alkuperäisestä laktoosipitoisuudesta. Tällöin propionihappoa ei ehtinyt muodostua lainkaan, koska pH laski liian nopeasti neutraloinnin loputtua.

Fermentoinnin optimointi oli myös vaikeaa laktobasillien ja propionihappobakteerien erilaisten kasvuvaatimusten vuoksi. Hitaampikasvuisina ja happamuudelle herkempinä propionihappobakteerit kärsivät yhteiskasvatuksesta laktobasilleja enemmän (Buchta 1983b). Propionihapon tuotto oli epävakaata ja jäi liian vähäiseksi suhteessa

maitohappoon. Myös maitohappokäyminen jäi heikoksi verrattaessa optimiolosuhteisiin, vaikka fermentointiaika oli laktobasilleille suhteellisen pitkä. Lisäksi tasalaatuisen happoseoksen fermentoimista hankaloittaa lähtöheran koostumuksessa esiintyvät vaihtelut, joita heran konsentroidimisella ja koostamisella useasta juustonvalmistuserästä voitaisiin tasoittaa. Tällöin on kuitenkin vaarana heran kontaminoituminen (saastuminen vierailta mikrobeilla) ja koostumuksen muuttuminen säilytyksen aikana.

Tuoreessa herassa on aina juustomaidosta peräisin olevia mikrobeja, juustonvalmistuksen yhteydessä lisättyjä hapatemikrobeja sekä muita heran eri käsittelyvaiheista peräisin olevia mikrobeja, joten mikrobikasvua ja entsyymaattisia reaktioita voi todennäköisesti tapahtua huoneenlämpötilassa tehdyn alkukäsittelyn aikana ja vähäisessä määrin myös kylmiösäilytyksen aikana. Mikro-suodatusta 0,5 µm:n kalvolla ei voida pitää riittävänä mikrobeja vähentävänä menetelmänä, varsinkaan jos lähtöherassa on runsaasti mikrobeja (Walsh & Headon 1994). Lämpötilan säätäminen useita mikrobeja suosivalle alueelle, pitkä fermentointiaika ja alkuvaiheen lähes neutraali pH ovat tekijöitä, jotka altistavat fermentoinnin virhekäymisille. Optimiolosuhteissa maitohappokäymisessä syntyy ravinnehävikkiä noin 5 – 10 % ja propionihappokäymisessä noin 23 %. Sivutuotteiden määrä

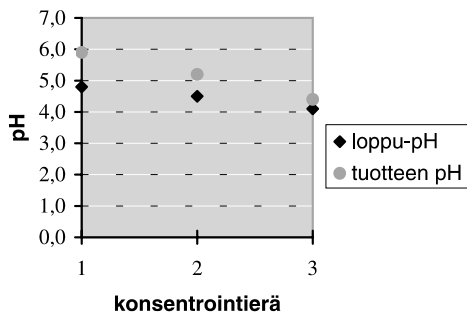
kasvaa, kun fermentointiolosuhteet eivät ole optimaaliset (Major & Bull 1989). Soke-ri- ja happohävikkiin vaikuttavat osaltaan myös alkukäsittely ja varastoinnin aikana herassa tapahtuvat muutokset sekä mahdolliset virhekäymiset.

### 3.2 Fermentointiliemen jälkikäsittely

Fermentointiliemi mikro- ja ultrasuodatettiin mikro- ja proteiinien poistamiseksi, sillä proteiinit häiritsevät haihdutusta. Proteiinimäärä väheni noin 0,1 %:iin ja samea liemi muuttui kirkkaan vihertäväksi liuokseksi suodatusten jälkeen.

Vettä haihduttamalla fermentointiliemi pyrittiin konsentroimaan noin 50 %:n maitohappopitoisuuteen. Fermentointiliemen suuri kuiva-ainepitoisuus ja erityisesti sokripitoisuus nostaa tuotteen viskositeettia konsentroidin aikana. Sokeria voi myös kiteytyä tuotteen kylmiösäilytyksen aikana, koska laktoosi on melko niukkaliukoinen sokeri. Laktoosin liukoisuus on 25 °C:ssa 216 g/(l vettä) (Heikonen & Salminen 1987). Toisaalta laktoosi muodostaa helposti ylikylläisiä liuoksia. Hapotetussa fermentointituotteessa II laktoosi saattoi myös hydrolysoitua konsentroidin aikana hapon ja lämmön vaikutuksesta helpommin liukeneviksi monosakkarideiksi, glukoosiksi ja galaktoosiksi.

**Kuva 4.** Konsentroidin pH:ta nostava vaikutus. Loppu-pH on mitattu fermentoinnin jälkeen ja tuotteen pH konsentroidin jälkeen.



Kuvassa 4 on esitetty konsentroidin pH:ta nostava vaikutus. Mitä korkeampi fermentointiliemen loppu-pH oli, sitä enemmän pH-arvo nousi myös konsentroidin aikana. Konsentroidin jälkeen alhaisin saavutettu tuotteen pH-arvo oli 4,4, jolloin sen maitohappo oli noin 71 %:sesti laktaattina.

Fermentointiliemen hapotusta kokeiltiin kationinvaihtomenetelmällä. Hapetus suoritettiin mikro- ja ultrasuodatetulle fermentointiliemelle ennen tuotteeksi konsentroidin, koska viskositeetin nousu olisi vaikeuttanut kationinvaihtoa. Suolojen Na<sup>+</sup>-ioneja korvautui H<sup>+</sup>-ioneilla ja samalla fermentointiliemen pH laski alle 1:n, jolloin maito-, propioni- ja etikkahappo olivat vapaina happoina. Samalla myös happoseoksen kuiva-ainepitoisuus laski hieman. Hapotuksen jälkeen liuoksen pH ei noussut konsentroidin aikana. Hapotetun erän, fermentointituotteen II, raaka-aineena käytettiin fermentointierän 5 (pH 4,5) fermentointiliettä, joten tuotteen sokripitoisuus jäi korkeaksi (Kuva 2, Taulukko 2).

Maito-, propioni- ja etikkahapot ovat täysin vapaina happoina, kun pH < 2. Tällöin hartsin kapasiteetti voidaan laskea kaavan 2 perusteella:

Kaava 2.

$$K_h = V_i c_m / m_h$$

$K_h$  on hartsin kapasiteetti, g maitohappoa/(g hartsia)

$V_i$  on ionivaihdettu liuostilavuus, jonka pH < 2, l

$c_m$  on kokonaishappoliuoksen pitoisuus, g/l

$m_h$  on hartsin määrä, g.

Kationinvaihtomenetelmällä saavutettiin hyvälle säilöntäaineelle riittävä happamuus (pH < 1). CS 24M-kationinvaihtohartsin kapasiteetti oli melko pieni, 167 mg maitohappoa/(g hartsia), mutta toisaalta se pysyi vakaina hartsimäärän lisäyksestä ja regeneroinnista riippumatta. Suolahappoa kului hartsin regeneroimiseen runsaasti ja samalla syntyi myös happojätettä. Kationinvaihto ei tämän kokeen perusteella ole käyttökelpoinen hapotusmenetelmä tuotantomitassa.



### 3.3 Nurmirehun säilöntä

Säilöntäkokeita varten korjattu nurmirehu- kasvusto oli varhaisessa kehitysvaiheessa. Tämän vuoksi säilöttyjen rehujen kuiva-aine- ja raakakuitupitoisuudet jäivät pieniksi, kun taas raakavalkuaispitoisuus oli melko suuri. Säilöttyjen rehujen sokeripitoisuutta ei määritetty, mutta esikuivatun rehun sokeripitoisuus saattoi olla pilvisen ja kostean sään takia tavanomaista pienempi. Säilöntäkokeessa käytetty raaka-aine oli siis säilönnällisiltä ominaisuuksiltaan vaatavaa materiaalia (Weissbach et al. 1974). Nurmirehun säilöntäkokeen tulokset on esitetty taulukossa 5 ja rehulle asetetut laaturajat taulukossa 6.

Rehujen pieneen kuiva-ainepitoisuuteen vaikutti raaka-aineen märkyiden lisäksi säilönnän vähäinen puristenestehävikki, joten koesiilojen painotuksesta huolimatta rehujen säilöntäolosuhteet eivät täysin vastanneet tavanomaisen suuren siilon olosuhteita. Tuoreen ja esikuivatun rehun kuiva-ainepitoisuudet poikkesivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan, vaikka esikuivatun rehun kuiva-ainepitoisuus jäikin pieneksi. Rehu saattoi kuitenkin osittain pilaantua jo pellolla suoritetun esikuivauksen aikana, koska sää oli lämmin ja kostea. Säilöntäaineen koostumus ja lisäsmäärä vaikuttivat osaltaan rehun kuiva-ainepitoisuuteen ja kemialliseen koostumukseen. Fermentointituotteen I kuiva-ainepitoisuus (60 %) oli suhteellisen korkea tuoreen ja esikuivatun rehun kuiva-ainepitoisuuteen (16 ja 21 %) verrattuna, joten tämän säilöntäaineen lisäsmäärän nousu nosti vastaavasti rehujen kuiva-ainepitoisuutta. Vastaavasti fermentointituotteen I nurmirehua niukemmat raakakuitu- ja raakavalkuaispitoisuudet näkyivät rehuanalyysissä näiden yhdisteiden hieman alempina pitoisuuksina verrattuna muurahaishapposäilöntään. Muurahaishapon lisäsmäärä oli pieni verrattuna fermentointituotteeseen I. Rehuissa, jotka säilöttiin ilman säilöntäainetta, tapahtui ilmeisesti vähäistä raakavalkuais- ja raakakuituhävikkiä. Tämän vuoksi ilman säilöntäainetta säilötyt rehut eivät poikkeaa mer-

kitsevästi raakavalkuais- ja raakakuitupitoisuuksien mukaan muurahaishapolla eivätkä fermentointituotteella I säilötyistä rehuista.

Koerehujen pH-arvot ylittivät muurahaishapolla säilöttyä tuoretta rehua lukuun ottamatta hyvälaatuiselle tuoreelle rehulle asetetun maksimi-pH-arvon 4,2 (Taulukko 6). Rehujen esikuivaus kohotti selvästi säilöntäaineen koostumuksesta ja käyttömäärästä riippumatta rehujen pH-arvoa, koska rehun kuiva-ainepitoisuuden lisääntyminen hillitsee säilörehun virheikäymisten ohella myös maitohappokäymistä (McDonald et al. 1991). Tässä kokeessa rehujen kuiva-ainepitoisuuden kohoaminen nosti kuitenkin suhteettoman nopeasti rehujen pH-arvoa, sillä kaikkien esikuivattujen rehujen keskimääräinen pH-arvo ylitti hyvälaatuiselle esikuivatulle säilörehulle asetetun maksimi-pH-arvon 4,3 (Taulukko 6). Esikuivattujen rehujen todennäköisesti vähäisestä sokerimäärästä saattoi kilpailla maitohappobakteereiden kanssa runsas virheikäymisiä aiheuttava mikrobisto, jonka kehittymistä suosi rehujen hidaskuivuminen esikuivauksen aikana (Jonsson 1989). Säilörehu ei happea yhtä tehokkaasti virheikäymisissä syntyvien happojen (etikka-, propioni- ja voihappojen) avulla kuin maitohapon avulla. Toisaalta fermentointituotteessa I maitohappo oli laktaattina, joten se ei pystynyt lisäämään rehun happamuutta suurinakaan pitoisuuksina muurahaishapon tavoin.

Korkeiden pH-arvojensa vuoksi koerehut olivat alttiita virheikäymisille, sillä kaikissa tuoreissa ja esikuivatuisissa rehuissa etikkahappopitoisuudet olivat liian korkeat. Fermentointituotteella I säilöttyjen rehujen etikkahaposta vain osa oli peräisin rehujen käymisestä, sillä myös rehuihin lisätty säilöntäaine sisälsi etikkahappoa (5 – 18 g/(kg ka)). Esikuivattujen rehujen voihappopitoisuudet olivat selvästi tuoreen säilörehun pitoisuuksia korkeampia. Esikuiva- tuista rehuista ainoastaan muurahaishapposäilöntä säilyi hyvänä voihappopitoisuuden perusteella, vaikka ero ei ollutkaan merkitsevä verrattuna fermentointituotteella I tai ilman säilöntäainetta tehtyihin säilöntöi-

**Taulukko 5.** Korjuutavan ja säilöntäaineen vaikutus säilörehun kemialliseen koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun.

	b) Tilastollinen merkitsevyys															
	Tuore säilörehu						Esikuvattu säilörehu									
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6				
<sup>a</sup> Säilöntä ka g/kg	160	161	164	188	194	206	209	219	212	231	228	234	Tuore vs. esik. ***	1 vs. 2 NS	1 vs. 3-6 ***	2 vs. 3-6 **
pH	4,58	3,94	4,68	4,57	4,65	4,55	5,18	4,67	5,28	4,98	5,02	5,09	***	***	NS	***
g/kg ka																
raakavalkuainen	216	218	205	206	203	201	210	216	207	213	209	205	NS	NS	NS	**
raakakuitu	240	247	242	235	234	226	237	250	234	235	236	227	NS	NS	NS	**
maitohappo	27	74	42	79	109	132	11	40	22	68	94	102	**	**	***	*
etiikkahappo	79	34	87	60	58	44	74	40	76	56	58	60	NS	***	**	***
g/kg tuore																
voihappo	0	0	0	0	0	0	2	0	7	7	7	6	**	NS	NS	NS
% kok.N																
liukoinen N	57	39	51	39	42	37	71	53	61	51	48	45	***	***	***	NS
ammoniikki N	10	5	9	5	6	3	15	9	12	8	7	9	***	***	***	NS

<sup>a</sup>Säilöntä

<sup>b</sup>Tilastollinen merkitsevyys

1) Kontrolli ilman säilöntäainetta Tuore vs. esik.) Tuureen ja esikuvattu säilörehun välinen ero NS) Ero ei tilastollisesti merkitsevä

2) Muurahaishappo 5 ml/kg 1 vs. 2) Kontrollin ja muurahaishapon välinen ero \*) p < 0,05

3) Fermentointituote 1 15 ml/kg 1 vs. 3 - 6) Kontrollin ja fermentointituotteen välinen ero \*\*) p < 0,01

4) Fermentointituote 1 30 ml/kg 2 vs. 3 - 6) Muurahaishapon ja fermentointituotteen välinen ero \*\*\*) p < 0,001

5) Fermentointituote 1 45 ml/kg

6) Fermentointituote 1 60 ml/kg

**Taulukko 6.** Laaturajat säilörehulle (<sup>a</sup>Hellämäki et al. 1998, <sup>b</sup>Moisio & Heikonen 1992).

Määrittäminen	Hyvä	Riskialtis	Huono	Merkitys
<sup>a</sup> pH tuore rehu	3,65 - 4,0	4,0 - 4,2	> 4,2 tai < 3,65	pH on tärkein tekijä
<sup>a</sup> pH esikuivattu rehu g/kg ka	3,65 - 4,1	4,1 - 4,3	> 4,3 tai < 3,65	laatua arvioitaessa
<sup>a</sup> Maitohappo*	35 - 80	20 - 30 tai 80 - 100	< 20 tai > 100	Rehua säilövä happo
<sup>a</sup> Etikkahappo	< 20	20 - 30	> 30	Virhekäyminen
<sup>b</sup> Sokeri	> 40	20 - 40	< 20	Käymisvara
% kok N				
<sup>a</sup> Liukoinen N	< 50	50 - 70	> 70	Valkuaisen hajoaminen
<sup>a</sup> Ammoniakki N g/kg tuore rehu	< 7	7 - 10	> 10	Valkuaisen hajoaminen
<sup>b</sup> Voihappo	< 1	1	> 1	Voihappokäyminen

\*) Muurahaishappopitoisuus on ilmoitettu maitohapoksi laskettuna

hin. Toisaalta kaikkien tuoreena säilöttyjen rehujen laatu oli voihappopitoisuuden perustella moitteeton, vaikka happamuus ei ollutkaan riittävä este voihappokäymiselle.

Ilman säilöntäainetta säilöttyjen rehujen maitohappo oli peräisin pelkästään rehun luontaisesta maitohappokäymisestä. Muurahaishapolla säilytyksessä rehussa maitohappona ilmoitettu happomäärä sisälsi rehun luontaisessa maitohappokäymisessä syntyneen maitohapon lisäksi rehuun lisätyn muurahaishapon maitohapoksi laskettuna. Fermentointituotteella I säilöttyjen rehujen maitohappomäärä koostui luontaisen maitohappokäymisen tuottamasta ja säilöntäainelisäyksen sisältämästä maitohaposta. Säilöntäaineiden käyttö lisäsi rehujen maitohappopitoisuutta verrattuna rehuihin, jotka säilöttiin ilman säilöntäainetta. Maitohappopitoisuus lisääntyi fermentointituotteen I lisäysmäärän mukaan, vaikka ainakin suurimpana lisäysmääränä tämä säilöntäaine hillitsi rehun luontaista maitohappokäymistä. Sekä muurahaishapon että fermentointituotteen I käyttö vähensi yhtä tehokkaasti säilörehujen raakavalkuaisen hajoamista ammoniakiksi.

### 3.4 Rehuviljan säilöntä

Rehuviljan säilöntäkokeen tulokset on esitetty taulukossa 7. Murskesäilötty rehuvilja säilyi hyvin, vaikka koerehujen maitohappokäyminen jäi vähäiseksi. Yleensä murskesäilötyn rehuviljan maitohappopitoisuus on 20 – 40 g/(kg ka) (Pettersson 1998). Maitohappokäymistä ei ollut tapahtunut juuri lainkaan säilöittäessä rehuviljaa happopitoisilla säilöntäaineilla, sillä rehuviljan maitohappopitoisuus vastasi muurahaishappolisäyksen ja fermentointituote II -lisäysten muurahaishappo- ja maitohappopitoisuuksia. Käytännössä säilönnän aikana osa lisätyistä haposta hajoaa, haihtuu tai poistuu puristenesteen mukana. Muurahaishaposta häviää yleensä n. 20 – 40 %, mutta maitohapon hävikki on todennäköisesti pienempi, koska se ei ole yhtä helposti haihtuva happo kuin muurahaishappo. Toisaalta muurahaishappo diffundoituu helposti koko rehumäärään, kun taas maitohappo pääsee liikkumaan vain yhtenäisessä nestefaasissa. Erityisesti rehun kuiva-ainepitoisuuden kasvaessa maitohapon vaikutus voi jäädä pesäkkeisiin, joiden ulkopuolella pääsee tapahtumaan virhekäymistä. Happolisäyksellä pH pyrittiin laskemaan tasolle, joka suosii maitohappobakteereita suhteessa pi-

**Taulukko 7.** Säilöntäaineen vaikutus murskesäilötyn rehuviljan kemialliseen koostumukseen ja säilönnälliseen laatuun.

<sup>a</sup> Säilöntä	Murskesäilötty rehuvilja					<sup>b</sup> Tilastollinen merkitsevyys					
	1	2	3	4	5	1 vs. 2	1 vs. 3, 4	2 vs. 3, 4	5 vs. 1	5 vs. 2	5 vs. 3, 4
ka g/kg	560	569	580	595	566	*	***	***	NS	NS	***
g/kg ka											
Raakavalkuainen	138	137	139	137	145	NS	NS	NS	**	***	***
Raakakuuti	77	70	63	66	74	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sokeri	25	23	32	35	38	NS	*	*	*	**	NS
Maitohappo	12	6	10	7	16	*	*	NS	NS	**	**
Etikkahappo	13	21	21	24	19	**	***	NS	**	NS	NS
Voihappo	0	0	0	0	0	NS	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>a</sup> Säilöntä	<sup>b</sup> Tilastollinen merkitsevyys
1) Kontrolli ilman säilöntäainetta	1 vs. 2) Kontrollin ja muurahaishapon välinen ero
2) Muurahaishappo 3 ml/kg	1 vs. 3, 4) Kontrollin ja fermentointituotteen välinen ero
3) Fermentointituote II 8 ml/kg	2 vs. 3, 4) Muurahaishapon ja fermentointituotteen välinen ero
4) Fermentointituote II 16 ml/kg	5 vs. 1) Heran ja kontrollin välinen ero
5) Hera 50 ml/kg	5 vs. 2) Heran ja muurahaishapon välinen ero
	5 vs. 3, 4) Heran ja fermentointituotteen välinen ero
	NS) Ero ei tilastollisesti merkitsevä
	*) $p < 0,05$
	***) $p < 0,01$
	****) $p < 0,001$

laaviin mikrobeihin. Käytännössä happamuus ja korkea kuiva-ainepitoisuus hillitsivät myös maitohappokäymistä.

Koeolosuhteet saattoivat myös suosia maitohapon muuttumista etikkahapoksi, sillä etikkahappopitoisuus oli poikkeuksellisen korkea. Murskesäilötyn rehuviljan etikkahappopitoisuus on yleensä alle 14 g/(kg ka) (Pettersson 1998). Fermentointituote II -lisäyksen aiheuttama etikkahappomäärä oli pieni (n. 1 g/(kg ka)), joten sillä ei ollut suurta merkitystä tulokseen. Voihappopitoisuuden perusteella kaikki kokeen rehut olivat hyvälaatuisia. Rehuviljan maito-, etikka- ja voihappopitoisuuksien mukaan fermentointituotteen II vaikutus vastasi muurahaishapon säilöntävaikutusta.

Hera tehosti säilönnän aikana rehun

luontaista maitohappokäymistä sisältäjänsä laktoosin ansiosta. Toisaalta myös heran lisäysmäärä oli muurahaishapon ja fermentointituotteen II lisäysmäärää suurempi, mikä saattoi osaltaan edistää rehuviljan tiivistymistä. Sokeripitoisuus oli yhtä korkea heralla ja fermentointituotteella II säilötyissä koerehuissa. Fermentointituote II sisälsi runsaasti (41 %) sokeria, mutta se ei kuitenkaan edistänyt rehun luontaista maitohappokäymistä. Sokerin maitohappokäymistä stimuloivaa vaikutusta estivät fermentointituotteessa II olevat vapaat hapot. Lisäksi fermentointituotteella II säilöttyjen koerehujen kuiva-ainepitoisuudet olivat suuret verrattuna herasäilöntään.

## 4 Yhteenveto

Maito-, propioni- ja etikkahapposeoksen fermentointi herasta oli monivaiheinen ja vaikeasti hallittava prosessi. Etenkin propionihapon osuus jäi happoseoksessa liian vähäiseksi, jotta sillä olisi ollut merkittävää säilönnällistä vaikutusta. Fermentointituotteen I vaikutus perustui happojen suoloihin. Tämän säilöntäaineen avulla ei saavutettu riittävää happamuutta nurmirehussa, minkä vuoksi virheikäymisten (etenkin voihappokäymisen) riski jäi vertailuna käytettyä muurahaishapposäilöntää suu-

remmaksi. Fermentointituotteen II vaikutus perustui pääasiassa vapaisiin happoihin, joiden vaikutus vastasi rehuviljaa säilöttäessä vertailuna käytettyä muurahaishappoa. Fermentointituotteen II suuresta sokeripitoisuudesta huolimatta maitohappokäyminen jäi tällä säilöntäaineella säilytyssä koerehussa herasäilöntää vähäisemmäksi. Rehuviljakokeessa säilöntä onnistui hyvin myös ilman säilöntäainetta, joten fermentointituotteen II tai heran säilönnällisiä ominaisuuksia ei voida taata tämän kokeen perusteella

## Kirjallisuus

---

**Ali-Yrkkö, S.** 1983. Klostridit juustonvalmistuksen häiriötekijänä. In: Juuston kypsyminen. Helsingin yliopiston maitotalouslaitos, Helsinki, 8.12.1983. Helsinki: Helsingin yliopisto. p.129–144. ISBN 951-46-7670-X.

**Blanch, H.W. & Clark, D.S.** 1997. Biochemical engineering. New York: Marcel Dekker. 702 p. ISBN 0-8247-0099-6.

**Buchta, K.** 1983a. Lactic acid. In: Dellweg, H. (ed.). Volume 3: Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources. Weinheim: Verlag Chemie. p. 409–418. ISBN 0-89573-043-X, ISBN 3-527-25765-9.

– 1983b. Organic acids of minor importance. In: Dellweg, H. (ed.). Volume 3: Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I, energy from renewable resources. Weinheim: Verlag Chemie. p. 467–478. ISBN 0-89573-043-X, ISBN 3-527-25765-9.

**Heikonen, M. & Salminen, K.** 1987. Heran laktoosin hyödyntäminen. Kemia-Kemi 14(3): 204–210.

**Helander, I.M., von Wright, A. & Mattila-Sandholm, T.-M.** 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends in Food Science & Technology 8(5): 146–150.

**Hellämäki, M., Helminen, J., Nousiainen, J., Pessi, T. & Vuorinen L.** 1998. ARTTURI-rehuanalyysi. Valion Alkutuotannon ja Jäsensuhteiden julkaisuja 1: 1–14.

**Huitson, J.J.** 1968. Cereals preservation with Propionic acid. Process Biochemistry. November: 31–32.

**Jonsson A.** 1989. The role of yeasts and clostridia in silage deterioration: identification and ecology. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för mikrobiologi. Rapport 42. 51 p.

**Kohler, W.** 1993. Propionic acid and derivatives: Use as food and feed preservative. In: Elvers, B., Hawkins, S., Russey, W. & Schulz, G. (eds.). Ullman's encyclopedia of industrial chemistry. 5. painos. Weinheim: VCH. Vol A 22: 229–230.

**Lee, Y.-K. & Wong, S.-F.** 1993. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk. In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds.). Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker. p. 97–109. ISBN 0-8247-8907-5.

**Major, N.C. & Bull, A.T.** 1989. The physiology of lactate production by *Lactobacillus delbrueckii* in a chemostat with cell recycle. Biotechnology and Bioengineering 34: 592–599.

**McDonald, P., Henderson, N. & Heron, S.** 1991. The biochemistry of silage. 2. painos. Marlow: Chalcombe. 340 p. ISBN 0-948617-22-5.

**Moisio, T. & Heikonen, M.** 1992. AIV-rehun perusteet. Helsinki: Kirjayhtymä. 170 p. ISBN 951-26-3772-3.

**Mäki, M.** 1997. The isolation and characterisation of a heterofermentative inoculant and its effect on silage quality and aerobic stability. *Finnish Journal of Dairy Science* 53(1): 1–173.

**Peltonen, M.** 1993. Säilöntäaineen käytön kannattavuus. *Työtehoseuran maataloustiedote* 427(5): 1–5.

**Pettersson, T.** 1998. Ensiled rolled barley grain to cattle: from harvest to milk and beef. Umeå: Swedish University of Agricultural Sciences. 30 p. ISBN 91-576-5534-0.

**Walsh, G. & Headon, D.R.** 1994. Protein biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons. 371 p. ISBN 0-471-94393-2, ISBN 0-471-94396-7.

**Weissbach, F., Schmidt, L. & Hein, E.** 1974. Method of anticipation of the run of fermentation in silage making based on chemical composition of green fodder. *Proceedings of the 12nd International Grassland Congress, Moscow, 11–20.6.1974.* Moscow: The Committee, 1974. 3: 663–673.

**Ye, K., Jin, S. & Shimizu, K.** 1996. Performance improvement of lactic acid fermentation by multi-stage extractive fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81(3): 240–246.

## FERMENTOINTIEN 1-6 TULOKSIA

Fermentointierä 1	Aineen pitoisuus alustassa (g/l)				Happojen saanto %	Sokereiden konversio %	Hävikki %
	PT 0:00 pH 5,8	PT 24:00 pH 6,0	PT 48:00 pH 5,3	PT 90:00 pH 4,8			
Alustan aine	43,4	0,0	0,0	0,0			
Laktoosi	0,5	9,6	4,7	0,1			
Galaktoosi	0,0	0,0	0,0	0,0			
Glukoosi							
SOKERIT yht.	43,9	9,6	4,7	0,1		100	
Maitohappo	3,2	18,1	22,9	25,6	51		
Propionihappo	0,0	1,9	4,2	4,8	11		
Etikkahappo	1,6	3,0	4,6	4,9	8		
HAPOT yht.	4,8	23,0	31,7	35,3	70		
SOKERIT ja HAPOT yht.	48,7	32,6	36,4	35,4			27

Fermentointierä 2	Aineen pitoisuus alustassa (g/l)				Happojen saanto %	Sokereiden konversio %	Hävikki %
	PT 0:00 pH 6,0	PT 24:00 pH 6,0	PT 48:00 pH 4,5	PT 69:30 pH 4,5			
Alustan aine	40,9	14,4	0,0	0,0			
Laktoosi	0,2	2,8	6,2	6,6			
Galaktoosi	0,0	0,9	0,0	0,0			
Glukoosi							
SOKERIT yht.	41,1	18,1	6,2	6,6		84	
Maitohappo	2,4	15,5	24,6	25,0	66		
Propionihappo	0,0	0,0	0,0	0,1	0		
Etikkahappo	1,3	3,0	3,2	3,2	6		
HAPOT yht.	3,7	18,5	27,8	28,3	71		
SOKERIT ja HAPOT yht.	44,8	36,6	34,0	34,9			22

Fermentointierä 3	Aineen pitoisuus alustassa (g/l)				Happojen saanto %	Sokereiden konversio %	Hävikki %
	PT 0:00 pH 6,0	PT 24:00 pH 6,1	PT 48:00* pH 5,1	PT 72:00 pH 4,9			
Alustan aine	39,1	2,3	0,0	0,0			
Laktoosi	0,5	12,1	2,0	0,2			
Galaktoosi	0,0	0,0	0,2	0,0			
Glukoosi							
SOKERIT yht.	39,6	14,4	2,2	0,2		99	
Maitohappo	2,0	19,4	15,4	26,7	63		
Propionihappo	0,1	0,8	0,5	0,6	1		
Etikkahappo	1,5	3,7	3,5	5,6	10		
HAPOT yht.	3,6	23,9	19,4	32,9	74		
SOKERIT ja HAPOT yht.	43,2	38,3	21,6	33,1			23

PT 48:00\* näytteen pitoisuudet liian alaiset: näytteeseen on sekoittunut mahdollisesti vettä.

stassa (g/l)

00 PT 71

1 pH 5

0,8

1,7

0,0

2,5

33,4

3,2

3,1

39,7

42,2

stassa (g/l)

00 PT 72

8 pH 4

15,9

3,2

0,0

19,1

27,5

0,2

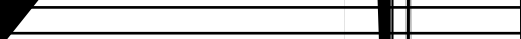
2,0

29,7

48,8

stassa (g/l)

47,1





Julkaisija



31600 JOKIOINEN

		Julkaisun sarja ja numero Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 52	
		Julkaisuaika (kk ja vuosi) Maaliskuu 1999	
Tekijä(t) Helmi Mikkonen, Marita Puikkonen, Erkki Joki-Tokola ja Liisa Myllykoski		Tutkimushankkeen nimi	
		Toimeksiantaja(t) Maatalouden tutkimuskeskus	
Nimike Heran fermentointituotteiden soveltuvuus rehun säilöntäaineiksi			
Tiivistelmä <p>Tämän työn tarkoituksena oli kehittää herapohjainen säilöntäaine nurmirehulle ja tuoreena säilöttävälle rehuviljalle. Tuote valmistettiin fermentoimalla heraa panostoimisesti <i>Lactobacillus delbrueckii</i>- ja <i>Propionibacterium freudenreichii</i>-bakteerikantojen avulla maito-, propioni- ja etikkahapoiksi. Fermentointituote sisälsi 43 - 51 % maitohappoa, 2 - 6 % etikkahappoa ja alle 1 % propionihappoa. Fermentointituotteen I teoreettinen säilöntävaikutus perustui näiden happojen suoloihin eli pääasiassa laktaatin ja asetaatin yhteisvaikutukseen. Säilöntävaikutus testattiin lisäämällä eri määriä fermentointituotetta I ensimmäisestä niitosta korjatun timoteinurmirehun (<i>Pleum prantense</i>) säilöntäaineeksi. Fermentointituotteella I säilöttyjen koerehujen säilönnällinen laatu jäi kuitenkin muurahaishapolla säilöttyä vertailurehua heikommaksi. Murskatun ohrarehuviljan säilönnässä käytetyn fermentointituotteen II säilöntävaikutus perustui ensisijaisesti vapaaseen maitohappoon. Rehuviljaa säilöttiin myös pelkällä heralla, jolloin säilöntä perustui laktoosin stimuloimaan maitohappokäymiseen. Vertailusäilöntäaineena käytetyn muurahaishapon ja fermentointituotteen II säilöntävaikutusten välillä ei ollut merkitsevää eroa. Rehuvilja säilyi hyvin myös ilman säilöntäainelisäystä.</p>			
Avainsanat etikkahappo, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , maitohappo, murskevilja, nurmirehu, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , propionihappo, säilörehu			
Toimintayksikkö Maatalouden tutkimuskeskus, Pohjois-Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasemantie 15, 92400 Ruukki			
ISSN 1238-9935	ISBN 951-729-539-1	<input type="checkbox"/> Tuloksia voi soveltaa luomuviljelyssä	
Myynti: MTT tietopalveluyksikkö, 31600 JOKIOINEN Puhelin (03) 4188 2327 Telekopio (03) 4188 2339		Sivuja 20 s. + 1 liite	Hinta

Vammalan Kirjapaino Oy 1999  
ISBN 951-729-539-1  
ISSN 1238-9935