บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แรกเริ่มมีจุดประสงค์ที่จะทดลองหาอัตราส่วนผสมของเอนไซม์กลุ่ม cellulase และกลุ่ม xylanase ที่เหมาะสมกับอาหารหยาบที่นิยมใช้ในประเทศไทย เช่น ฟางข้าวและต้นข้าวโพดหมัก อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดเมืองไทย เพราะ activity ของเอนไซม์ยังไม่เสถียร จะมีจำหน่ายเฉพาะกลุ่มไซแลนเนส และมีเฉพาะ endo - 1-4 beta xylanase เพียงชนิดเดียว จึงมีการศึกษาวิจัยเพียงการทดลองเดียวที่ใช้เอนไซม์ชนิดเดียว (บทที่ 3) การศึกษาวิจัยต่อๆ มา (บทที่ 4 – 7) จึงใช้เอนไซม์รวมที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า แต่ได้มีการตรวจสอบวิเคราะห์ activity ของผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทางการค้าทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อที่จะได้ทราบ activity ของเอนไซม์แต่ละชนิดในผลิตภัณฑ์นั้นๆ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทั้งชนิดเดียว (single enzyme) และชนิดรวมหลายชนิด (mixed enzymes หรือ cocktail enzymes) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า

การทดลองแรก มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซแลนเนสต่อการย่อยสลายและการหมักย่อยในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจากระเพาะที่ได้รับอาหารที่มีฟางข้าวเป็นอาหารหลัก ใช้โคไม่ให้นมเจาะกระเพาะจำนวน 3 ตัว จัดโคเข้าทดลองตามแผนการทดลองแบบ 3 x 3 Latin squares design ประกอบด้วย 3 ระยะการทดลอง ๆ ละ 21 วัน กลุ่มการทดลองประกอบด้วย 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มที่เสริม 10 g xylanase/d และ 3) กลุ่มที่เสริม 20 g xylanase/d เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเอนไซม์ทางการค้า (endo-1, 4-beta-xylanase, EC 3.2.1.8) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใยชนิดผง (Porzyme® 93010; Danisco Animal Nutrition) โคแต่ละตัวจะได้รับอาหารข้น 17% โปรตีน วันละ 3 กิโลกรัม ร่วมกับฟางข้าวที่ให้กินอย่างเต็มที่ และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา ผลการทดลองพบว่า การเสริมเอนไซม์ไม่มีผลต่อการกินได้วัตถุแห้ง ระดับความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะหมัก ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน นอกจากนี้ การเสริมเอนไซม์ยังไม่มีผลต่อ DM และ ADF potential disappearance fraction, DM และ ADF total disappearance อย่างไรก็ตาม NDF potential disappearance fraction, NDF total disappearance เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ในระดับสูง ในขณะที่ Hemicellulose degradability ที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนส ความเข้มข้นของ Total volatile fatty acids, molar proportion of acetate, propionate และ butyrate และ ratio of acetate : propionate ในแต่ละระยะเวลา ไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสเช่นกัน

การทดลองต่อมาได้ทำการทดลอง 2 การทดลองเพื่อประเมินผลของสารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก โดยใช้ 48 h batch culture *in vitro* assay ร่วมกับสารบัฟเฟอร์ และ ruminal fluid ดำเนินการทดลองที่ 1 (Exp. 1) และการทดลองที่ 2 (Exp. 2) โดยใช้แผนการ

ทดลอง completely randomized design และในแต่ละการทดลองประกอบด้วย 2 runs และแต่ละ run มี 4 ซ้ำ สารเสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด (E1, E2, E3, and E4) เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งให้ endoglucanase, exoglucanase และ xylanase activities หลากหลาย สำหรับทั้ง xylanase (birch wood และ oat spelt substrate) และ endoglucanase (carboxymethylcellulose substrate) สามารถจัดอันดับของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (per ml) ได้ดังนี้ E4>E1>E2>E3 ในการทดลองที่ 1 (Exp. 1) เสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับ 0, 2, 4 และ 8μl/g of corn silage dry matter (DM) ในขณะที่ในการทดลองที่ 2 (Exp. 2) เสริมเอนไซม์ที่ระดับ 0, 0.5, 1, 2 และ 4μl/g DM ทำการวัดผลผลิตแก๊ส (gas production; GP) หลังการบ่มที่ 3, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชม. ทำการหา disappearance of DM (DMD), neutral detergent fiber (NDFD) และ acid detergent fiber (ADFD) และความเข้มข้นของ volatile fatty acid (VFA; total and individual molar proportions) หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E2 ส่งผลให้ NDFD และ ADFD ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. สูงกว่า ($P<0.001$) ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 และ E4 การเพิ่มระดับการเสริมเอนไซม์สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ในทุกผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (ยกเว้น ADFD ของเอนไซม์ E4 ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม.) ซึ่งระดับการเสริมที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของ enzyme additive (dose x enzyme; $P<0.01$) มีบางกลุ่มการทดลองที่ส่งผลต่อ DMD และ total GP ที่ 24 และ 48 ชม. แต่ผลตอบสนองนี้ไม่สอดคล้องกับผลตอบสนอง NDFD และ ADFD

การทดลองที่ 2 ดำเนินการเพื่อยืนยันผลของเอนไซม์และระดับการเสริมที่เหมาะสมของเอนไซม์ DMD ไม่ถูกกระทบจากการเสริมเอนไซม์ หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. และไม่พบว่ามี enzyme x dose interactions ของ DMD, NDFD, หรือ ADFD หลังการบ่มที่ 24 หรือ 48 ชม. (ยกเว้น ADFD ที่ 48 ชม.) หลังการบ่มที่ 24 ชม. DMD, NDFD, และ ADFD เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามระดับการเสริมที่เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ส่วนหลังการบ่มที่ 48 ชม. DMD เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามระดับการเสริมที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ NDFD เพิ่มขึ้นแบบ quadratic ตามระดับการเสริมที่เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ADFD เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงหลังการบ่มที่ 48 ชม. เมื่อเสริมเอนไซม์ E3 และ E4 แต่หลังการบ่มที่ 48 ชม. ADFD เพิ่มขึ้นแบบ quadratic เมื่อเสริมเอนไซม์ E1 และ E2 สำหรับ total GP มีค่าต่ำที่สุดสอดคล้องกันเมื่อเสริมเอนไซม์ E4 ทั้ง 2 ระยะเวลาบ่ม ($P<0.05$) ไม่พบว่ามี enzyme x dose interactions ($P>0.05$) ของตัวแปรกระบวนการหมัก ทั้งที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ในการทดลองที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่ามีความแตกต่างของ total VFA ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ($P\leq0.05$) กล่าวคือ การเพิ่มระดับการเสริมเอนไซม์ส่งผลให้ total VFA ลดลง หลังการบ่มที่ 24 ชม. แต่ total VFA กลับเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ซึ่งที่ทุกระดับการเสริมจะทำให้ total VFA สูงกว่ากลุ่ม control ($P<0.001$)

สรุปในภาพรวมได้ว่า enzyme additives สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของต้นข้าวโพดหมัก ในการทดลองแบบ *in vitro* อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ E1 และ E2 จะมีประสิทธิภาพมากกว่าเอนไซม์ E3 หรือ E4 ผลตอบสนองต่อการเพิ่มระดับ

การเสริมจะเป็นแบบ linear หรือ curvilinear และระดับการเสริมที่เหมาะสมจะแตกต่างกันระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ทำการประเมิน การประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ปกติจะนำไปสู่การจัดอันดับของผลิตภัณฑ์สารเสริม และการย่อยสลายของ NDF และ ADF จะมีประโยชน์ในการจำแนกประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ดีกว่าการย่อยสลาย DM และ total GP

การทดลองที่ 3 มีจุดประสงค์เพื่อทำการประเมินผลของสารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก 4 ชนิด ใช้วิธี batch culture *in vitro* assay ร่วมกับ medium และ ruminal fluid แผนการทดลองเป็นแบบ complete randomized design ประกอบด้วย 2 runs และแต่ละ run มี 4 ซ้ำ ผลิตภัณฑ์ enzyme additives (E1, E2, E3, และ E4) เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าซึ่งมี endoglucanase, exoglucanase และ xylanase activities ที่แตกต่างกัน เสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ลงในต้นข้าวโพดหมัก ที่ระดับ 0 และ 4 μl/g of corn silage dry matter (DM) ทำการวัด gas production (GP) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชม. หลังการบ่ม วิเคราะห์หา degradability ของ DM (DMD), neutral detergent fiber (NDFD), acid detergent fiber (ADFD) และความเข้มข้นของ volatile fatty acid (VFA; total and individual molar proportions) หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. มีความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่าง enzyme additives และ control เกี่ยวกับผลของเอนไซม์ต่อ DMD, NDFD, ADFD และ TGP ยกเว้น TGP ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. ที่เอนไซม์ทุกชนิดให้ผลเหมือนกัน แต่มีความแตกต่าง ($P<0.05$) เกี่ยวกับผลระหว่างเอนไซม์กับกลุ่ม control ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E2 มีผลทำให้ DMD, NDFD และ ADFD สูงกว่าเอนไซม์ E3, E4 และ control ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 และ E4 มีผลทำให้ DMD, NDFD และ ADFD สูงกว่า control ($P< 0.05$) ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา ผลของชนิดของ corn silage substrates มีความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่างชนิดของ corn silage substrate เกี่ยวกับผลต่อ DMD, NDFD, ADFD และ TGP สำหรับ DMD, NDFD, ADFD และ TGP ไม่พบว่ามี enzyme × corn silage substrate interactions ($P \geq 0.05$) ทั้งที่ระยะเวลาบ่มที่ 24 หรือ 48 ชม. และที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ไม่พบความแตกต่าง ($P>0.05$) ระหว่าง enzyme additives และ control เกี่ยวกับผลต่อ rumen fermentation profile สำหรับผลของ corn silage substrates มีความแตกต่าง ($P<0.05$) ระหว่าง corn silage substrate เกี่ยวกับผลต่อ ruminal fermentation profile สรุปในภาพรวมได้ว่า enzyme additives แสดงผลตอบสนองในเชิงบวกในทุก corn silage substrates (เพิ่ม DMD, NDFD, ADFD และ TGP) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 และ E4

การทดลองที่ 4 เพื่อประเมินผลของ enzyme additives 8 ชนิด ต่อการหมักย่อยฟางข้าวในกระเพาะหมัก โดยใช้วิธี batch culture *in vitro* assay ที่ประกอบด้วย medium และ ruminal fluid ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. แผนการทดลองเป็นแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 2 runs และมี 4 ซ้ำ ผลิตภัณฑ์ enzyme additive ทั้งหมด เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทางการค้า ที่มีความผันแปรของ

endoglucanase, exoglucanase และ xylanase activities ระดับการเสริมของเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิด คือ 0, 2 and 4 μl/g of rice straw dry matter (DM) ทำการวัด gas production (GP) ที่เวลา 3, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชม. หลังการบ่ม หาค่า degradability ของ DM (DMD), neutral detergent fiber (NDFD) และ acid detergent fiber (ADFD) ภายหลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. หลังจากการบ่ม 24 ชม. Degradability ของ DM, NDF และ total gas production (TGP) ไม่มีผลกระทบจาก enzyme additives อย่างไรก็ตาม degradability ของ ADF เพิ่มขึ้นเมื่อเสริม enzyme additives ($P<0.05$) หลังจากการบ่ม 48 ชม. ผลของ enzyme additives ต่อ degradability ของ DM และ TGP เหมือนกัน ($P>0.05$) แต่ degradability ของ NDF เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) โดย enzyme additives ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา มีความแตกต่าง ($P<0.05$) ระหว่างชนิดของ enzyme additives เกี่ยวกับผลต่อ degradability ของ ADF การเสริม exogenous fibrolytic enzymes สามารถเพิ่ม *in vitro* degradation ของฟางข้าว แต่ในแต่ละผลิตภัณฑ์เอนไซม์สแดงผลตอบสนองที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับระดับการเสริมเอนไซมื (enzyme × dose interaction, $P<0.05$) มีความแตกต่างระหว่าง enzyme additives สำหระบ total VFA ทั้งที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ($P<0.05$); การเพิ่มระดับการเสริมเอนไซม์ ทำให้เพิ่ม total VFA หลังการบ่ม 24 และ 48 ชม. นั่นคือ ทุกระดับการเสริมเอนไซม์จะส่งผลให้มี total VFA สูงกว่า control ($P<0.001$) สรปโดยรวม enzyme additives แสดงผลตอบสนองในเชิงบวกของ rice straw substrates (เพิ่ม NDFD และ ADFD) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 มีประสิทธิภาพมากกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ชนิดอื่นๆ

การทดลองสุดท้าย เพื่อประเมินผลของ fibrolytic enzyme additives 2 ชนิดต่อการย่อยได้ของต้นข้าวโพดหมัก และการหมักย่อยในกระเพาะหมัก ระดับ pH และความเข้มข้นของ blood glucose ในโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะ โดยใช้โคไม่ให้นมลูกผสม Holstein Friesian เจาะกระเพาะ จำนวน 5 ตัว เลี้ยงขังเดี่ยวในคอก สุ่มจัดโคเข้ากลุ่มการทดลอง 5 กลุ่มการทดลองตามแผนการทดลองแบบ 5 x 5 Latin squares design การทดลองประกอบด้วย 5 ช่วงระยะการทดลอง ระยะการทดลองละ 21 วัน โดยในช่วง 14 วันแรกเป็นช่วงปรับตัวเข้ากับอาหาร และอีก 7 วันสำหรับเก็บตัวอย่างในกระเพาะหมัก และการหาการย่อยสลาย *in vivo* กลุ่มอาหารทดลองประกอบด้วย 0 (control), 0.5 ml of E1 /kg of corn silage dry matter (DM), 1.0 ml of E1 /kg of corn silage DM, 1.0 ml of E2 /kg of corn silage DM และ 1.5 ml of E2 /kg of corn silage DM โคแต่ละตัวจะได้รับอาหารข้นที่มีโปรตีน 21% วันละ 3 ก.ก./ตัว แบ่งเป็น 2 มื้อเท่าๆ กัน เวลา 0800 และ 1600 น. ร่วมกับต้นข้าวโพดหมักให้แบบเต็มที่ และน้ำสะอาด การเสริม enzyme additives ในอาหารไม่มีผลต่อ dry matter intake (DMI), ความเข้มข้นของ total volatile fatty acid (VFA), NH_3, molar proportions of individual VFA, ruminal pH ใน rumen fluid และความเข้มข้นของ blood glucose ส่วน degradability ของ dry matter (DMD), neutral detergent fiber (NDFD) และ acid detergent fiber (ADFD) ไม่ถูกกระทบจากการเสริม enzyme additives ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก

3, 6 และ 12 ชม. (P>0.05) อย่างไรก็ตาม การเสริม fibrolytic enzyme สามารถเพิ่ม DMD, NDFD และ ADFD หลังจากการบ่มในกระเพาะหมัก 24, 48 และ 72 ชม. (P<0.05) ผลการทดลองนี้เป็นเช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาทดลองทั้งแบบ *in vitro* และแบบ *in vivo* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ามีการเพิ่มการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในต้นข้าวโพดหมักเมื่อทำการเสริมด้วย enzyme additive

Abstract

The present research firstly aimed to determine the optimum ratio of cellulase to xylanase suited for widely used roughages in Thailand i.e. rice straw and corn silage. However, the only single enzyme sold in the Thai market was xylanase (endo - 1-4 beta xylanase) while cellulases were not present due to unstable of the products. Thus, the use of single enzyme was only conducted in one experiment in Chapter 3. The subsequent researches (Chapter 4 – 7) were carried out using commercial produced enzyme products, however, activity of individual enzyme products was determined to obtain exact activity of each enzyme products. Therefore, the present research studies used both single enzyme product and mixed or cocktail enzyme products which were commercially produced products.

The 1st research aimed to determine the effect of xylanase product on ruminal disappearance and rumen fermentation of rice straw based diet was evaluated in fistulated non-lactating dairy cows. Three fistulated non-lactating dairy cows were used in 3 x 3 Latin squares design; the trial consisted of 3 periods of 21 d in each period. Treatments were: 1) control, 2) 10 g xylanase/cow/d, and 3) 20 g xylanase/cow/d. The commercial xylanase enzyme (endo-1, 4-beta-xylanase, EC 3.2.1.8) which was a fibrolytic enzyme powder (Porzyme® 93010; Danisco Animal Nutrition) was used in this study. Diets offered as 3 kg/d of concentrate containing 17 % CP together with ad libitum rice straw and clean water. Enzyme did not change dry matter intake, ruminal pH and NH_3-N concentrations. DM and ADF potential disappearance fraction, DM and ADF total disappearance were unaffected by the enzyme supplementation, however, NDF potential disappearance fraction, NDF total disappearance were increased when the enzyme was added at a high dose. Hemicellulose degradability in 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hour were unaffected by supplementation of

xylanase. Total volatile fatty acids concentration, molar proportion of acetate, propionate and butyrate and ratio of acetate: propionate at each hour of incubation were unaffected by xylanase.

The subsequent study, 2 experiments were conducted to evaluate the effect of four enzyme additives on ruminal fermentation of corn silage using a 48 h batch culture *in vitro* assay with buffer and ruminal fluid. Experiment 1 (Exp. 1) and Experiment 2 (Exp. 2) were conducted as completely randomized designs each with two runs and four replicates. The enzyme additives (E1, E2, E3, and E4) were commercial products that provided a range in endoglucanase, exoglucanase, and xylanase activities. For both xylanase (birch wood and oat spelt substrate) and endoglucanase (carboxymethyl cellulose substrate), the enzyme products (per ml) were ranked E4>E1>E2>E3. In Exp. 1, the four enzymes were added at 0, 2, 4, and 8μl/g of corn silage dry matter (DM), whereas in Exp. 2 enzymes were added at 0, 0.5, 1, 2, and 4μl/g DM. Gas production (GP) was measured at 3, 6, 12, 18, 24, and 48 h after incubation. Disappearance of DM (DMD), neutral detergent fiber (NDFD), and acid detergent fiber (ADFD), and volatile fatty acid concentrations (VFA; total and individual molar proportions) were determined after 24 and 48 h. In Exp. 1, E1 and E2 had higher NDFD and ADFD at 24 and 48 h of incubation ($P<0.001$) compared with E3 and E4. Increasing dose rate increased NDFD and ADFD for all enzymes (except ADFD for E4 at 48 h), with the optimum dose rate dependent on the enzyme additive (dose x enzyme; $P<0.01$). There were some treatment effects on DMD and total GP at 24 and 48 h, but these responses were not consistent with responses in NDFD and ADFD.

Experiment 2 was conducted to confirm the effects and optimum dose rate of each enzyme additive. In Exp. 2, DMD was not affected by enzyme after 24 and 48 h incubation. There were no enzyme x dose interactions for DMD, NDFD, or ADFD after 24 or 48 h of incubation (except for ADFD at 48 h). After 24 h, DMD, NDFD, and ADFD increased linearly with increasing dose ($P<0.05$); after 48 h DMD increased linearly, whereas NDFD increased quadratically with increasing enzyme dose ($P<0.05$). The ADFD increased linearly after 48 h for E3 and E4, but after 48 h ADFD increased quadratically for E1 and E2. Total GP was consistently lowest for E4 at both incubation times ($P<0.05$). There were no enzyme x dose interactions ($P>0.05$) for any of the fermentation variables at either 24 or 48 h of incubation

in Exp. 2. There were differences amongst the additives for total VFA at 24 and 48 h ($P \leq 0.05$); increasing enzyme dose decreased total VFA after 24 h but increased total VFA at 48 h, such that all doses were higher than the control ($P < 0.001$).

Overall, the enzyme additives increased NDFD and ADFD of corn silage in vitro; however, E1 and E2 were more effective than E3 or E4. Responses to increasing dose of enzyme were generally linear or curvilinear, and the optimum dose rate differed amongst the products evaluated. Evaluation of the enzymes at 24 and 48 h generally led to the same ranking of the additives, and the degradation of NDF and ADF was more useful in differentiating the enzymes compared with DM and total GP

The 3rd study was conducted to evaluate the effect of four enzyme additives on ruminal fermentation of four corn silages using a 48 h batch culture in vitro assay with medium and ruminal fluid. The experiment was conducted as a completely randomized design with two runs and four replicates. The enzyme additives (E1, E2, E3, and E4) were commercial products that provided a range in endoglucanase, exoglucanase, and xylanase activities. The four enzymes were added at 0, and 4 μl/g of corn silage dry matter (DM). Gas production (GP) was measured at 3, 6, 12, 18, 24, and 48 h post incubation. degradability of DM (DMD), neutral detergent fiber (NDFD), acid detergent fiber (ADFD), and volatile fatty acid concentrations (VFA; total and individual molar proportions) were determined after 24 and 48 h. At 24 and 48 h incubation, there was difference ($P < 0.05$) between enzyme additives and control in terms of their effects on DMD, NDFD, ADFD, and TGP. Except TGP at 24 h incubation, all enzyme additives were similar, but were difference ($P < 0.05$) in their effects between enzyme additive and control. The E1 and E2 had higher DMD, NDFD, and ADFD than E3, E4 and control <0.05); however, E3 and E4 had higher effects than control ($P < 0.05$). At both incubation times, the effects of corn silage substrates, there were difference ($P < 0.05$) between corn silage substrate in terms of their effects on DMD, NDFD, ADFD, and TGP. For all parameters, DMD, NDFD, ADFD and TGP, there were no enzyme × corn silage substrate interactions ($P \geq 0.05$) at either 24 or 48 h of incubation. At 24 and 48 h incubations, there were no difference ($P > 0.05$) between enzyme additives and control in terms of their effects on rumen fermentation profile. For the effects of corn silage substrates, there were differences ($P < 0.05$) between corn silage substrate in terms of their effects on ruminal fermentation profile. Overall, enzyme additives show positive response in

all corn silage substrates (increased DMD, NDFD, ADFD and TGP), however, product E1 and E2 were more effective than E3 and E4.

The final study was conducted to evaluate the effect of two fibrolytic enzyme additives on the digestibility of corn silage and ruminal fermentation, pH and blood glucose concentration of fistulated non-lactating dairy cows. Five fistulated Crossbred Holstein Friesian non-lactating dairy cows housed in individual pens were assigned to one of five treatments in 5 x 5 Latin squares design. The trial consisted of 5 periods, with 21 d in each period, 14 d for adaptation to diets and 7 d for ruminal sample collection and *in vivo* disappearance trial. Dietary treatments were: 0 (control), 0.5 ml of E1 /kg of corn silage dry matter (DM), 1.0 ml of E1 /kg of corn silage DM, 1.0 ml of E2 /kg of corn silage DM and 1.5 ml of E2 /kg of corn silage DM. Diets offered as 3 kg/d of concentrate containing 21 % crude protein (CP), divided into 2 equal meals at 0800 and 1600 h together with *ad libitum* corn silage and clean water. Addition of enzyme additives to the diet had no effect on dry matter intake (DMI), ruminal fluid concentrations of total volatile fatty acid (VFA), NH_3, molar proportions of individual VFA, ruminal pH and blood glucose concentration. The degradability of dry matter (DMD), neutral detergent fiber (NDFD), and acid detergent fiber (ADFD) were not affected by enzyme additives at 3, 6 and 12 h of ruminal incubations ($P>0.05$). However, addition of fibrolytic enzyme increased DMD, NDFD and ADFD after 24, 48 and 72 h of ruminal incubations ($P<0.05$). Those results were similar observed in both *in vitro* and *in vivo* studies; it might be due to increase the utilization of nutrients of corn silage when treated with enzyme additive.