รหัสโครงการ SUT3-303-53-36-27

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงการใช้ประโยชน์ได้ทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยการเสริมเอนไซม์ เซลลูเลสและไซแลนเนส หรือส่วนผสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

(Improving nutritional utilization of ruminant feeds through cellulase and xylanase supplementation or combination of these 2 enzymes)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-53-36-27

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงการใช้ประโยชน์ได้ทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยการเสริมเอนไซม์ เซลลูเลสและไซแลนเนส หรือส่วนผสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

(Improving nutritional utilization of ruminant feeds through cellulase and xylanase supplementation or combination of these 2 enzymes)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2558

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.

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ (ไทย)		ก
บทคัดย่อ ..(อังกฤษ)		จ
สารบัญ		ฌ
สารบัญตาราง		ฏ
สารบัญภาพ		ฑ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
	2.1 อาหารโคนม	2
	2.2 องค์ประกอบของเยื่อใย	2
	2.3 เอนไซม์ (Enzyme)	5
	เอกสารอ้างอิง	12
บทที่ 3	ผลของการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสต่อการย่อยในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับฟางข้าว	15
	บทคัดย่อ	15
	Abstract	15
	3.1 บทนำ	16
	3.2 อุปกรณ์และวิธีการ	17
	3.3 ผลการทดลอง	19
	3.4 วิจารณ์ผลการทดลอง	23
	3.5 สรุป	25
	เอกสารอ้างอิง	25
บทที่ 4	การใช้ fibrolytic enzymes additives เพื่อเพิ่มการหมักย่อย *in vitro* ในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก	28
	บทคัดย่อ	28
	Abstract	29
	4.1 บทนำ	30
	4.2 อุปกรณ์และวิธีการ	32
	4.3 ผลการทดลอง	35

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
	4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง	48
	4.5 สรุป	54
	เอกสารอ้างอิง	54
บทที่ 5	ผลของ exogenous fibrolytic enzymes ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมัก *in vitro* ของต้นข้าวโพดหมัก 4 ชนิด	58
	บทคัดย่อ	58
	Abstract	59
	5.1 บทนำ	60
	5.2 อุปกรณ์และวิธีการ	60
	5.3 ผลการทดลอง	64
	5.4 วิจารณ์ผลการทดลอง	71
	5.5 สรุป	72
	เอกสารอ้างอิง	72
บทที่ 6	ผลของการใช้ exogenous fibrolytic enzyme ต่อการหมักย่อยฟางข้าว *in vitro*	75
	บทคัดย่อ	75
	Abstract	75
	6.1 บทนำ	76
	6.2 อุปกรณ์และวิธีการ	77
	6.3 ผลการทดลอง	78
	6.4 วิจารณ์ผลการทดลอง	85
	6.5 สรุป	87
	เอกสารอ้างอิง	88
บทที่ 7	ผลของ exogenous fibrolytic enzyme ต่อการย่อยได้ในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับต้นข้าวโพดหมัก	89
	บทคัดย่อ	89
	Abstract	89
	7.1 บทนำ	90
	7.2 อุปกรณ์และวิธีการ	91

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

7.3 ผลการทดลอง..... 92
7.4 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 97
7.5 สรุป..... 98
เอกสารอ้างอิง..... 98
บทที่ 8 สรุปภาพรวมผลการทดลอง และการนำไปใช้ประโยชน์..... 100
ประวัติผู้วิจัย..... 102

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

Table		หน้า
2.1	กลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย β-glucan ในอาหารสัตว์.....	8
2.2	Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation in dairy cows' diet on digestibility.....	10
2.3	Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation in dairy cows' diet on milk yield and milk composition.....	11
3.1	Chemical composition of feeds.....	19
3.2	Effect of xylanase supplementation onfeed intake, ruminal pH and NH_3-N of fistulated non-lactating dairy cows.....	20
3.3	Effect of xylanase supplementation on volatile fatty acid (VFAs) of fistulated non-lactating dairy cows.....	21
3.4	Effect of xylanase supplementation on ruminal disappearance coefficients of rice straw.....	22
4.1	Enzyme activity of the four enzyme additives used.....	38
4.2	Effect of enzyme (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 1).....	39
4.3	Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 1).....	42
4.4	Effect of enzyme additives (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2).....	44
4.5	Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2).....	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

Table		หน้า
5.1	Chemical composition of substrates incubated *in vitro*.....	62
5.2	Effect of enzyme (E) and corn silage on nutrient degradability (%)and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation.....	65
5.3	Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation.....	69
6.1	Enzyme activity of the 8 enzyme additives (pH 6.5).....	78
6.2	Effect of enzyme (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from rice straw after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid.....	80
6.3	Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation.....	82
7.1	Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on feed intake, ruminal pH, NH3-N and blood glucose of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage.....	93
7.2	Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on volatile fatty acid (VFAs) of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage.....	94
7.3	Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage.....	96

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส $(C_2H_{10}O_5)_n$.....	3
2.2	ลักษณะโครงสร้างของไซแลน.....	3
2.3	แสดงส่วนประกอบของเยื่อใย.....	4
2.4	สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ cellulase ย่อยเซลลูโลส.....	10
4.13	Percentage increase in neutral detergent fiber disappearance (NDFD) and acid detergent fiber disappearance (ADFD) from corn silage after 24 and 48 h of incubation in Experiment 1 and Experiment 2.....	53

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

อาหารโคนมประกอบด้วยอาหารหยาบและอาหารข้น ซึ่งอาหารหยาบจัดเป็นอาหารหลักสำหรับโคนม จะมีปริมาณเยื่อใย (fiber) เป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง และมีการย่อยได้ต่ำ อาหารหยาบประเภทเยื่อใยส่วนใหญ่ ได้แก่ พืชตระกูลหญ้า พืชตระกูลถั่ว และผลพลอยได้ทางการเกษตรต่างๆ เช่น ฟางข้าว ต้นและเปลือกข้าวโพด เป็นต้น โดยทั่วไปอาหารเยื่อใยจะประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เพกติน (pectin) และลิกนิน (lignin) เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของพืช (cell wall) สำหรับโคนมอาหารประเภทเยื่อใยมีความสำคัญอย่างมาก โคนมจำเป็นต้องได้รับอย่างเพียงพอทั้งปริมาณและคุณภาพ เพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์โดยจุลินทรีย์ภายในกระเพาะหมัก (rumen) เพื่อหมักย่อยจนได้ผลผลิตสุดท้าย คือ กรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) ซึ่งจัดเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับโคนม นอกจากนี้ยังช่วยในการรักษาสภาพสมดุลภายในกระเพาะหมักอีกด้วย และเมื่อโคนมได้รับอาหารเยื่อใยอย่างเพียงพอ จะส่งผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การให้ผลผลิต และทำให้โคนมมีสุขภาพที่ดี โดยเฉพาะการใช้ฟางข้าว จัดเป็นแหล่งอาหารหยาบที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ในฟางข้าวจะมีเยื่อใยค่อนข้างสูง การย่อยได้ต่ำและย่อยไม่สมบูรณ์ ทำให้การใช้ประโยชน์ได้ต่ำ จึงเกิดปัญหาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการหมักย่อยอาหารเยื่อใยภายในกระเพาะหมักของโคนม ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตของโคนม และทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหาแนวทางเพื่อที่จะเพิ่มการย่อยได้ของอาหารประเภทเยื่อใยให้สูงขึ้น โดยการเสริมเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยอาหารเยื่อใยในกระเพาะหมักและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากอาหาร ซึ่งจะส่งผลต่อผลผลิตของโคนม ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาถึงผลของการใช้ fibrolytic enzyme ต่อการย่อยได้ในหลอดแก้ว เพื่อหาระดับที่เหมาะสมของการใช้ในสัตว์เคี้ยวเอื้อง และศึกษาผลของการใช้ fibrolytic enzyme ในระดับที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเยื่อใยและปริมาณของกรดไขมันระเหยได้ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารโคนม

อาหารข้น หมายถึง วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีความเข้มข้นของโภชนะต่อหน่วยน้ำหนักสูง ส่วนมากจะมีเยื่อใยต่ำกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ อาจจะเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดเดียวหรือหลายชนิดประกอบกันเป็นสูตรอาหาร แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ อาหารโปรตีน อาหารพลังงาน และอาหารเสริมแร่ธาตุและวิตามิน

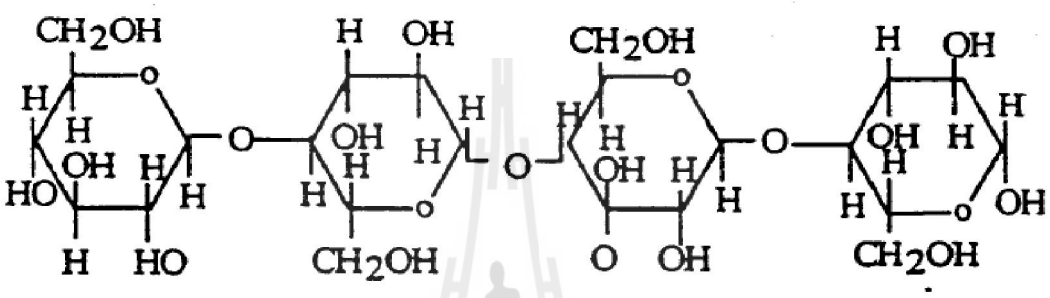
อาหารหยาบ หมายถึง อาหารที่มีเยื่อใยสูงกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ มีโภชนะย่อยได้ต่ำ มีน้ำหนักต่อหน่วยปริมาตรอาหารน้อย ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่ ต้นและใบพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น พืชตระกูลหญ้าและถั่วต่างๆ รวมถึงวัสดุเหลือใช้ต่างๆ ที่สามารถนำมาเป็นอาหารโคได้ เช่น ยอดอ้อย ต้นข้าวโพดและฟางข้าว

2.2 องค์ประกอบของเยื่อใย

พืชวัตถุดิบอาหารสัตว์ทุกชนิดจะมีปริมาณของเยื่อใยทั้งนั้น แต่จะแตกต่างกันเพียงปริมาณที่พบเท่านั้นโดยเยื่อใยจะประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิดและมีส่วนของคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนในสัดส่วนมากกว่า ความแตกต่างของเยื่อใยพืช นอกจากจะแตกต่างระหว่างชนิดพืชแล้ว ในพืชชนิดเดียวกันแต่อายุต่างกันก็จะมีสัดส่วนของเยื่อใยต่างกัน โดยเยื่อใยของพืชจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อพืชและส่วนที่เป็นผนังเซลล์ ส่วนมากจะเป็นส่วนของคาร์โบไฮเดรต คาร์โบไฮเดรตที่พบในส่วนเนื้อเยื่อของพืชส่วนใหญ่จะเป็นพวกแป้ง (starch) และน้ำตาล (sugar) แป้งและน้ำตาลจำพวกที่พบในเนื้อเยื่อของพืช ได้แก่ glucose, fructose และ sucrose ซึ่ง monosaccharides เหล่านี้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เลยโดยไม่ต้องถูกย่อยสลายก่อน และเนื้อเยื่อของพืช ยังมีแป้งและน้ำตาลจำพวก polysaccharides ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ก็ต่อเมื่อถูกย่อยสลายเป็น monosaccharides ก่อน polysaccharides เหล่านี้จะถูกสะสมอยู่ในรูปแป้ง (starch) ในส่วนของผนังเซลล์พืช จะประกอบด้วย cellulose และ hemicellulose นอกจากนี้ยังมีสารประกอบ pectin (pectic substances) รวมทั้ง lignin และ silica อยู่ด้วย (แสดงในรูปที่ 1) ซึ่งคาร์โบไฮเดรต จัดเป็นแหล่งพลังงานหลักในอาหารโคนม และโดยปกติแล้วในอาหารโคนม จะประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต อยู่ถึงร้อยละ 60-70 หน้าที่หลักของ คาร์โบไฮเดรต คือเป็นแหล่ง พลังงานของ จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและของตัวสัตว์เอง นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ในการรักษาสุขภาพของระบบทางเดินอาหาร

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรค์ ที่มีประมาณร้อยละ 45 -50 ในผนังเซลล์พืช cellulose จะมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์เส้นตรง ไม่มีกิ่งก้านสาขา เป็นพอลิเมอร์ ของ D-glucose ประกอบด้วย D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) glycosidic linkages ซึ่งพันธะ

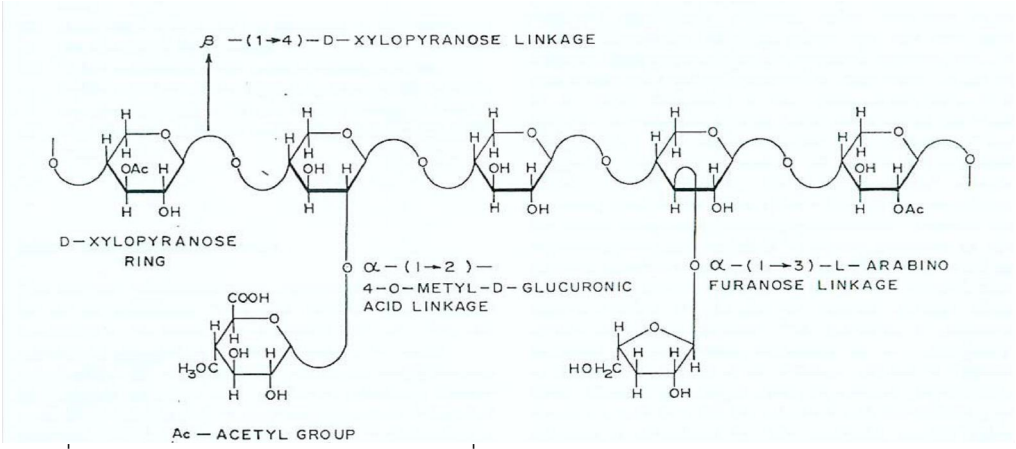
ดังกล่าวไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของสัตว์ได้ แต่จะถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่สามารถ hydrolyze ได้ คือ เอนไซม์ cellulase โดยเซลลูโลสจะมีค่า degree of polymerization อยู่ในช่วงประมาณ 100 ถึงมากกว่า 10,000 ซึ่งเกาะรวมกันภายใน crystalline microfibrils เซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20,000 ถึง 750,000 ดาลตัน ซึ่งเท่ากับ 100 ถึง 4,000 หน่วยโมเลกุลกลูโคส โมเลกุลของเซลลูโลสเรียงตัวกันเป็นมัดเรียกว่า fibril โดยมีพันธะไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ใกล้กันของเซลลูโลสสานหนึ่งกับอีกสายหนึ่งเชื่อมต่อกันเป็น fibril นอกจากนั้นเซลลูโลสที่พบในทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งมีความทนทานต่อกรดได้มีกว่าเฮมิเซลลูโลส



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของเซลลูโลส $(C_2H_{10}O_5)_n$

ที่มา: Eriksson (1990)

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบ polysaccharides ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พบมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส โดยพบประมาณร้อยละ 20 -30 ในผนังเซลล์พืช สามารถสกัดออกได้ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง เฮมิเซลลูโลสเป็นสารประกอบเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ โครงสร้างหลักประกอบด้วย D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-xylose และ L-arabinose เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ glycosidic linkages นอกจากนี้อาจมี uronic acid เป็นองค์ประกอบด้วย ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในเฮมิเซลลูโลสโดยมีโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) linkage ของน้ำตาลไซโลส และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ และมีการแตกแขนงออกไปประกอบด้วย methyl-glucoronic acid, glucose, galactose และ arabinose

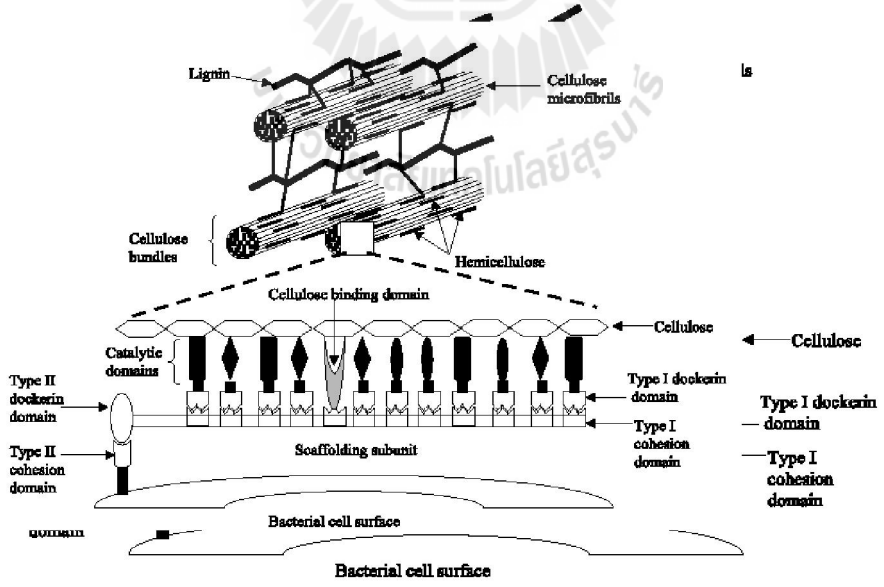


ภาพที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างของไซแลน ที่มา: Eriksson (1990)

ลิกนิน (lignin) ไม่จัดเป็นคาร์โบไฮเดรต แต่มักจะอยู่รวมกันกับ cellulose ในส่วนของผนังเซลล์พืช เป็นส่วนที่มีความแข็งแรงมากของพืช ถ้าพืชยิ่งแก่ lignin ยิ่งมาก ทำให้ย่อยได้ยาก เพราะเอนไซม์จากสัตว์ และจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยได้ นอกจากนี้ยังทำให้เอนไซม์ต่างๆ เข้าย่อยโภชนะต่างๆ ได้น้อยอีกด้วย lignin เป็น polymer ของอนุพันธ์ของ phenyl-propane ประกอบด้วย comaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol

เพกติน (pectin) เป็นกลุ่มของ polysacharides และเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชและองค์ประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ของพืช โครงสร้างของ pectin เป็นสันตรง เป็น polymer ของ D-galacturonic acid เชื่อมต่อกันประมาณ 200 โมเลกุล โครงสร้างจะมีหมู่ carboxyl คือ methylated ($COOCH_3$) เป็นองค์ประกอบอยู่จำนวนมาก นอกจากนี้ยังประกอบด้วยน้ำตาลต่างๆ ได้แก่ D-galactose, L-arabinose และ D-xylose

อาหารเยื่อใย เช่น พืชอาหารสัตว์ต่างๆ ที่โคกินเข้าไปจะได้รับการย่อยจากจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก ในกระเพาะหมักของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีกลุ่มจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยเยื่อใยได้ โดยมีกลุ่มเชื้อราเป็นกลุ่มแรกที่เข้าย่อยสลายส่วนของเยื่อใยอาหารเป็นส่วนแรก ซึ่งเชื้อราจะช่วยลดการจับยึดแน่นของอนุภาคชิ้นอาหาร ทำให้ผิวของอาหารแตกเปราะ ส่งเสริมให้แบคทีเรียเข้ายึดเกาะและย่อยสลายเยื่อใยได้ดีขึ้น (เมธา, 2533) จุลินทรีย์เหล่านี้จะสังเคราะห์ผลผลิตสุดท้ายที่มีความสำคัญต่อสัตว์ คือ กรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid,VFAs) จุลินทรีย์โปรตีน (microbial protein , MCP) และวิตามินบีรวม (Vitamin B complex) เป็นต้น ซึ่งสัตว์จะดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายและสร้างผลผลิต เช่น เนื้อและน้ำนม



ภาพที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบของเยื่อใย

ที่มา : Krause et al. (2003)

2.3 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ (Enzyme) คือ สารประกอบอินทรีย์จำพวกโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน ทำหน้าที่แตกต่างจากโปรตีนโดยทั่วไปคือมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับสภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสางมีชีวิตทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารที่ทำปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า ซับสเตรต (substrate)

2.3.1 ประเภทของเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. Endogenous enzyme หมายถึง เอนไซม์ซึ่งปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์โดยธรรมชาติและมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เป็นไปได้ทั้งในลักษณะที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและไม่ต้องการ

2. Exogenous enzyme หมายถึง เอนไซม์ที่เติมลงในกระบวนการแปรรูปเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆที่ต้องการ โดยทั่วไปการนำเอนไซม์มาใช้ในการเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องก็จะเป็นรูปแบบ exogenous enzyme ทั้งสิ้นซึ่งในปัจจุบันมีการนำมาใช้ทั้งรูปเอนไซม์อิสระ เอนไซม์ดัดแปลงทางเคมี และเอนไซม์ดัดแปลงพันธุกรรม

2.3.2 แหล่งที่มาของเอนไซม์ที่ย่อยเยื่อใย

เอนไซม์ ที่ใช้ในอาหารสัตว์ในปัจจุบัน เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นเชื้อรา แบคทีเรีย หรือยีสต์ บางชนิดเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงทางพันธุกรรม ซึ่งอาจจะด้วยวิธีการ ทำให้เกิดการผ่าเหล่าไปในทางที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ที่ดีขึ้น หรือปรับปรุงโดยวิธีพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มจำนวน ยีนที่ควบคุมการผลิต เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์มากขึ้น หรือแม้กระทั่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีน เพื่อให้เกิดเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติที่ดีตามที่ต้องการได้ เอนไซม์หลักๆ ที่ใช้ได้แก่ Amylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอาหารจำพวกแป้ง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งสัตว์จะดูด ซึมไปใช้ในการสร้างพลังงานได้ แหล่งของเอนไซม์ชนิดนี้ ส่วนใหญ่ได้จากยีนของเชื้อรา จัดเป็นเอนไซม์ ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีอยู่ตามปกติในทางเดินอาหารของสัตว์ แต่ในลูกสัตว์เล็กๆ ซึ่งระบบ น้ำย่อยยังทำงานได้ไม่เต็มที่ แต่ต้องถูกแยกจากแม่และถูกเลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จ การเสริมด้วยเอนไซม์นี้ นับว่าจำเป็นอย่างยิ่ง

จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักที่สำคัญต่อกระบวนการหมักย่อยเยื่อใย สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว

- แบคทีเรีย (Rumen bacteria) แบคทีเรียกลุ่มที่สำคัญต่อการหมักย่อยเยื่อใย ได้แก่ Cellulolytic bacteria โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ออกมา สามารถย่อยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้ ซึ่งเป็นการสลายพันธะ β-linkage ของน้ำตาลกลูโคส (glucose) และเพนโตส (pentose) จุลินทรีย์กลุ่ม Cellulolytic bacteria นี้ ถือว่ามีความสำคัญสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมาก

และชนิดที่สำคัญที่สุด ได้แก่ Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens และ Butyrivibrio fibrisolvens (เมธา, 2533 และ ฉลอง, 2541) โดย R. albus ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ H, Ethanol, Acetate, Lactate ส่วน R. flavefaciens ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ H, Formate, Acetate, Lactate, Succinate และ B. fibrisolvens ได้ผลผลิตสุดท้าย คือ ส่วนใหญ่เป็น Succinate และอาจมี Acetate, Lactate บ้าง

- รา (Rumen fungi) กลุ่มเชื้อรา เป็นกลุ่มที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการหมักย่อยภายในกระเพาะหมัก โดยช่วยย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และไซแลน (xylan) ได้ผลผลิตเป็น Acetate, Lactate, Carbon dioxide และ H^+ เชื้อรา เชื่อว่าเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแรกที่เข้าไปย่อยโครงสร้างของเยื่อใย โดยย่อยจากส่วนด้านในก่อน ซึ่งจะไปลดการยึดจับแน่นของเส้นใย ทำให้เกิดการแตกของเส้นใยได้ง่าย ส่งผลให้แบคทีเรียเข้าไปย่อยสลายได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้เชื้อราอาจจะช่วยทำลายพันธะของเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และทำให้ลิกนินสลายได้ในกระเพาะหมัก แต่จะไม่ย่อยลิกนินโดยตรง ดังนั้นเชื้อราจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการเข้าย่อยอาหารประเภทเยื่อใย (เมธา, 2533; ฉลอง, 2541)

- โปรโตซัว (Rumen protozoa) จะพบโปรโตซัวอาศัยอยู่ภายในกระเพาะหมักประมาณ 10^5 – 10^6 protozoa/ml โปรโตซัวที่อยู่ในกลุ่ม Cellulolytic จะอยู่ใน genus Epidinium ซึ่งจะสร้างและหลั่งเอนไซม์มาย่อยผนังเซลล์พืช ส่วน genus อื่นๆ ที่มีส่วนในการย่อยอีก คือ Entodieomorphs โปรโตซัวกลุ่มดังกล่าว จะหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็น Acetic acid, Butyric acid และ Lactic acid เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็สามารถสร้าง Propionic acid, H, Carbon dioxide และแก๊ส Methane ได้ด้วย (ฉลอง, 2541)

Cellulase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส จากการศึกษาแหล่งของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ เช่น รา และแบคทีเรีย จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ต่างกัน ทั้งนี้สภาพแวดล้อมจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมในการให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุพวกเซลลูโลสแตกต่างออกไป เมื่อเซลลูโลสถูกย่อยสลายเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ละลายน้ำได้ โมเลกุลเหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานและสารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์

เอนไซม์เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งมีหลายองค์ประกอบ (multicomponent enzyme) โดยมีองค์ประกอบของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิด ทำงานร่วมกันดังนี้

1. Endo-β- 1,4 glucan glucanohydrolase หรือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอนไซม์นี้ไม่สามารถโฮโดรไลซ์ส่วนที่เป็นผลึก เช่น ใยฝ้าย แต่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึกและอนุพันธ์เซลลูโลสได้ เช่น คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ เบตา 1,4 (β-1,4-linkage) ภายในเซลลูโลส ซึ่งจะทำให้ความยาวของสายเซลลูโลสสั้นลง และความหนืด

ลดลงอย่างรวดเร็ว บริเวณปลายสายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ จะเป็นบริเวณที่มีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลาย คือ เซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrin) ที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน นอกจากนี้ยังมีเซลลูไบโอส (cellobiose) และกลูโคส แต่พบในปริมาณที่น้อยมาก

2. Exo-β-1,4-glucan glucanohydrolase หรือ เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายส่วนปลายของเซลลูโลสด้านที่ไม่มีความสามารถในการรีดิวซ์ (non reducing end) ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอส

3. β-glucosidase หรือเซลโลไบเอส (cellobiase) จะเป็นตัสเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนส โดยทำหน้าที่ช้วยเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายเซลโลไบโอสได้ผลผลิตเป็นกลูโคส

xylanase สามารถย่อยอะราบิโนไซแลน ในอาหารสัตว์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและเป็นสาเหตุทำให้ระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีความหนืดเพิ่มขึ้น หน้าที่หลักของเอนไซม์ไซแลนเนส คือ ย่อยสลายพันธะของไซแลนที่มีไซโลสเป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลต่าง ๆ ดังนั้นจากโครงสร้างที่ซับซ้อนของไซแลนจึงต้องการกิจกรรมของระบบเอนไซม์ที่ประกอบด้วยกลุ่มเอนไซม์หลายชนิดที่ทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลัก ได้แก่ Endo β 1,4-xylan xylohydrolase และ β–xylosidase ส่วนเอนไซม์ที่ย่อยกิ่งก้านได้แก่ อัลฟาอะรา บิโนฟูราโนซิเดส (α –arabinofuranosidase), อัลฟากลูคูโรนิเดส (α –glucuronidase) และอะเซทิลเอส เตอเอส (acetyl esterase) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มทำงานร่วมกันในการเปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลส (Sunna and Antranikien, 1997)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลนจัดอยู่ในกลุ่ม glycan hydrolase ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะ 1,4–xylopyranosyl linkage ของ arabinoxylan arabino 4–0–methyl–D–glucuronoxylan และ glucuronoxylan เอนไซม์ดังกล่าวนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1 . Endo β 1,4-xylan xylohydrolase เอนไซม์นี้ทำหน้าที่ย่อยสลาย พันธะ β–1,4 glycosidic ของ xylopyranoside แบบสุ่มโดยจะย่อยสลายโมเลกุลของไซแลนซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก เช่น xylobiose xylotriose xylotetraose ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และสายพันธุ์จุลินทรีย์ xylanase ยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการย่อยสลาย
1,3 –L-arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan คือ arabinose–liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ xylose และ arabinose non arabinose–liberating endoxylanase เป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยสลาย arabinoxylan และ arabinoglucuronoxylan ตรงตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลของ xylose และ arabinose

2 . Exo–β 1,4–xylan xylohydrolase หรือเรียกสั้น ๆ ว่า β–xylosidase ซึ่ง ย่อยสลายโมเลกุลของไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ xylanase ทำให้ได้

โมเลกุลของไซไลสโดยที่เอนไซม์นั้นจะย่อยสลายโมเลกุลของ xylooligosaccharide ของน้ำตาลไซไลสจากปลาย non–reducing ทีละโมเลกุล

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย ß-glucan ในอาหารสัตว์

Common name	Systematic name	Action
Cellulase	1,4-(1,3;1,4)-ß-D-glucan 4-glucanohydrolase	Endohydrolysis of 1,4 linkages in cellulose and ß-D-glucans containing 1,3 and 1,4 linkages
ß-glucosidase	ß-D-glucoside glucohydrolase	Hydrolysis of terminal nonreducing ß-D-glucosyl residues, with the release of ß-D-glucose
Endo-1,3-ß-glucanase	1,3-ß-D-glucan glucanohydrolase	Endohydrolysis of 1,3 linkages in 1,3-ß-D-glucans
Exo-1,3-ß-glucanase	1,3-ß-D-glucan glucohydrolase	Exohydrolysis of 1,3 linkages in 1,3-ß-D-glucans, with the release of α-glucose
Endo-1,2-ß-glucanase	1,2-ß-D-glucan glucanohydrolase	Endohydrolysis of 1,2 linkages in 1,2-ß-D-glucans
Exo-1,4-ß-glucanase	1,4-ß-D-glucan glucohydrolase	Exohydrolysis of 1,4 linkages in 1,4-ß-glucans
Endo-1,6-ß-glucanase	1,6-ß-D-glucan glucanohydrolase	Endohydrolysis of 1,6 linkages in 1,6-ß-glucans

ที่มา: Pitson et al. (1993).

2.3.3 สมบัติของเอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ (Perry, 1995)

1. เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความเสถียรเมื่อเข้าไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Enzyme stability in the animal) เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกัน โดยเฉพาะในกระเพาะของสัตว์มีค่าความเป็นกรดสูง เอนไซม์ที่ใช้จะต้องสามารถทนและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะในสัตว์กระเพาะเดี่ยว (non-ruminant) เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความสามารถในการทำงานสูงซึ่งต้องสัมพันธ์กับเวลาการเคลื่อนที่ผ่านของอาหารในกระเพาะที่มี

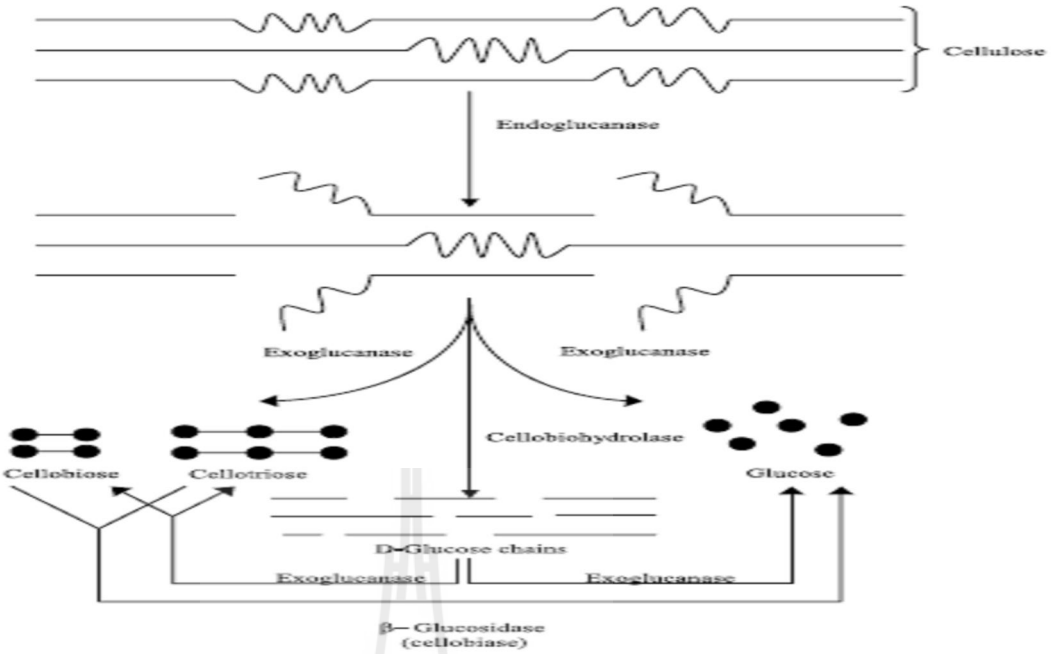
ระยะเวลาสั้นด้วย (McCLEARY, 2001) นอกจากนี้เอนไซม์ต้องมีความสามารถในการทนต่อเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในกระเพาะสัตว์

2. เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความเสถียรเมื่อเติมลงในอาหารสัตว์ (Enzyme stability in the feed) เนื่องจากอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์แต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบของอาหารต่างกัน เอนไซม์จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหารสัตว์นั้น ๆ โดยไม่เสียสภาพก่อนที่จะนำอาหารนั้นไปให้สัตว์กิน

3. เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความเสถียรในระหว่างขั้นตอนการผลิตและหลังจากขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์ (Enzyme during and after processing) เอนไซม์ที่ใช้ในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่ไม่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง แต่ในขั้นตอนการผลิตอาหารสัตว์จำเป็นต้องใช้อุณหภูมิสูงมากกว่า 60 องศาเซลเซียส เช่น การผสมกับอาหารในรูปของเหลวหรือการอัดเม็ด อาจทำให้เอนไซม์นั้นสูญเสียประสิทธิภาพในการทำงานได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อเอนไซม์ผสมอยู่ในรูปอาหารเม็ดแล้วกิจกรรมของเอนไซม์จะยังคงเหลืออยู่ดีกว่าในรูปอาหารเหลวและสามารถป้องกันเอนไซม์จากการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสในกระเพาะสัตว์ได้อีกด้วย (Chesson, 1993)

4. การทำปฏิกิริยากันระหว่างซับสเตรตและเอนไซม์ (Interaction between the substrate and the enzyme) เอนไซม์ที่ใช้จะต้องมีความจำเพาะต่อซับสเตรตคือส่วนประกอบที่มีอยู่ในอาหารสัตว์ โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์เติมลงไปเพื่อย่อยส่วนที่สัตว์ไม่สามารถย่อยได้ เช่น สารพวกnon-starch polysaccharide (beta-glucan arabinoxylan mannan galactan และ xyloglucan) ซึ่งพบได้ในธัญพืชต่าง ๆ (Choct, 1997)

5. ความสามารถของสัตว์ในการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยซับสเตรตของเอนไซม์ไปใช้ (Ability of the animal to utilize the reaction product of the enzyme) ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์จะเป็นสารโมเลกุลเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอะมิโน กรดไขมัน และสารอินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งสัตว์สามารถที่จะย่อยและดูดซึมไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 2.4 สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ cellulase ย่อยเซลลูโลส
ที่มา : Krause et al. (2003)

Table 2.2 Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation in dairy cows' diet on digestibility

Treatments	Forage	Digestibility (%)			References
		DM	NDF	ADF	
Control	24% corn silage	61.7[b]	42.5[b]	31.7[b]	Rode et al.
Enzyme 1.3 g/kg of TMR	15% alfalfa hay	69.1[a]	51.0[a]	41.9[a]	(1999)
Control	22.5% barley silage	64.7[b]	43.1[b]	37.6	Beauchemin et
Enzyme 1.22 ml/kg of TMR DM	22.5% alfalfa silage	67.3[a]	44.2[a]	42.5	al. (2000)
Enzyme 3.67 ml/kg of TMR DM		64.7[b]	39.9[c]	40.3	
Control	10% barley silage	-	38.8[b]	41.6	Yang et al.
1 g enzyme mixture/kg of hay	45% cubed alfafal hay	-	41.2[ab]	42.4	(1999)
2 g enzyme mixture/kg of hay		-	43.6[a]	45.3	
1 g enzyme mixture/kg of DM		-	42.4[ab]	42.5	
Control 2 g enzyme/kg of DM	45% corn silage	71.4[b]	50.1	47.9	Sutton et al.
sprayed on TMR	15% grass silage	72.4[a]	50.4	45.3	(2003)
sprayed on concentrates		70.7[b]	50.8	45.7	
infused into rumen		71.4[b]	49.8	49.0	

[abc] mean with different superscript within the same column significantly differed at $p<0.05$

จากตารางที่ 2.2 แสดงถึงผลของการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารโคนมต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ของอาหารเยื่อใย โดย Sutton et al. (2003)และ Beauchemin et al. (2000) พบว่าเมื่อมีการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารมีผลทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ในส่วนของ DM แตกต่างจากกลุ่มที่ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Yang et al. (2000) ที่มีผลเช่นกัน ส่วน Rode et al. (1999) พบว่าเมื่อมีการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของ DM, NDF และ ADF ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์ที่เสริมในอาหารมีผลไปช่วยเพิ่มการย่อยสลายอาหารเยื่อใยที่อยู่ในกระเพาะหมัก และอาหารเยื่อใยมีมากพอสำหรับการทำงานของเอนไซม์จึงทำให้การย่อยได้เพิ่มขึ้น ทำให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น ซึ่งอาจจะส่งผลต่อผลผลิตน้ำนมที่เพิ่มขึ้นต่อไป

Table 2.3 Effects of exogenous fibrolytic enzyme supplementation in dairy cows' diet on milk yield and milk composition

Treatments	Milk yield (kg/d)	%Fat	%Protein	%Lactose	References
Control	39.6^{b}	3.99^{a}	2.95^{a}	4.89^{ab}	Lewis et al.
1.25 ml/kg forage DM	40.8^{b}	3.83^{ab}	2.87^{b}	4.91^{ab}	(1999)
2.50 ml/kg forage DM	45.9^{a}	4.00^{a}	2.88^{b}	4.92^{a}	
5.00 ml/kg forage DM	41.2^{b}	3.75^{b}	2.85^{b}	4.81^{b}	
Control	37.0^{b}	2.80^{ab}	3.14^{ab}	-	Kung et al.
2 ml/kg forage DM	39.5^{a}	2.91^{a}	3.19^{a}	-	(2000)
5 ml/kg forage DM	36.0^{b}	2.52^{b}	2.96^{b}	-	
Control 50 mg/kg of DM	35.3^{b}	3.34	3.18	4.65	Yang et al.
sprayed on TMR	35.2^{b}	3.14	3.13	4.56	(2000)
applied to concentrate	37.4^{a}	3.19	3.13	4.65	
Control	44.0	3.54	3.14	4.79^{b}	Elwakeel et
1 g/cow/d	44.3	3.62	3.14	4.92^{a}	al. (2007)
5 g/cow/d	43.4	3.48	3.10	4.89^{a}	
15 g/cow/d	44.1	3.43	3.14	4.88^{a}	

^{ab} mean with different superscript within the same column significantly differed at $p<0.05$

จากตารางที่ 2.3 แสดงถึงผลของการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารโคนมต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนม พบว่า เมื่อมีการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารโคนมทำให้ปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มที่ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Lewis et al. 1999; Yang et al. 1999; Kung et al. 2000) ตรงข้ามกับ Elwakeel et al. (2007) ที่พบว่าเมื่อมี

การเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารโคนม ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตน้ำนมเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ควบคุม ส่วนด้านองค์ประกอบของน้ำนม มีผลค่อนข้างหลากหลาย คือ เมื่อมีการเสริม fibrolytic enzyme ในอาหารโคนม ไม่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบน้ำนม (Yang et al., 2000) Elwakeel et al. (2007) พบว่า การเสริม Fibrolytic enzyme ในอาหาร ทำให้เปอร์เซ็นต์แลตโต๊สเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารอ้างอิง

เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 473 หน้า

ฉลอง วชิราภากร. 2541. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเบื้องต้น. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 218 หน้า.

Attwood, G.T. and K. Reilly. 1995. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. Journal of Applied Bacteriology. 79: 22-29

Beauchemin, K. A., L. M. Rode, M. Maekawa, D. P. Morgavi and R. Kampen. 2000. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. J. Dairy Sci. 83:543–553.

Benchaar, C., S. Calsamiglia, A. V. Chaves, G. R. Fraser, D. Colombatto, T. A. McAllister and K. A. Beauchemin. 2008. A review of plant derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 145:209-228.

Castillejos L. S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2006. Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in In Vitro Systems. J. Dairy Sci. 89:2649–2658

Chesson, A. 1993. Feed Enzymes. Animal Feed Science and Technol. 45 : 65-79.

Choct, M. 1997. Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. Feed Milling International. June Issue: 13-26

Elwakeel, E. A., E. C. Titgemeyer,2 B. J. Johnson, C. K. Armendariz, and J. E. Shirley. 2007. Fibrolytic Enzymes to Increase the Nutritive Value of Dairy Feedstuffs. J. Dairy Sci. 90:5226–5236

Eriksson, K.-E.L., R. A. Blanchette and P. Ander. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of wood and Wood Components. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 407 p.

Hobson, P. N. (1969). Rumen bacteria. In: Methods in microbiology, 3B, (Norris,. J. R. & Ribbons, D. W. (Eds)), London, Academic Press, 133-49.

Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood and C. S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen : microbiology, ecology and genomics. FEMS Microbiology Reviews. 27:663-693.

Kung, L., Jr., R. J. Treacher, G. A. Nauman, A. M. Smagala, K. M. Endres and M. A. Cohen. 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 83:115–122

Lewis, G. E., W. K. Sanchez, C. W. Hunt, M. A. Guy, G. T. Pritchard, B. I. Swanson and R. Treacher. 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 82:611–617.

Menke, K.H. and H. Steingass. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:7.

Perry, F. G. 1995. Biotechnology in Animal Feeds.. In John, W. R. and A. Chesson, eds. Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. VCH. pp. 1-15

Pitson, S.M.; Seviour, R.J.; McDougall, B.M. 1993. Noncellulolytic fungal -glucanases: their physiology and regulation. Enzyme and Microbial Technology, 15, 178–192.

Rode, L. M., W. Z. Yang and K. A. Beauchemin. 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 82:2121–2126.

Sunna, A. and G. Antranikien. 1997. Xylanolytic enzyme from fungi and bacterial. Critical Review in Biotechnol. 17: 39-67.

Sutton, J. D., R. H. Phipps, D. E. Beever, D. J. Humphries, G. F. Hartnell, J. L. Vicini and D. L. Hard. 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-friesian cows. J. Dairy Sci. 86:546–556.

TechnoInhome. 2549. บทปฏิบัติการที่ 6 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน. เข้าข้อมูลออนไลน์จาก www.thechnoinhome.com

Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Br. Grass Soc. 18, 104–111.

Yang, W. Z., K. A. Beauchemin and L. Rode. 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82:391–403.

Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2000. A Comparison of Methods of Adding Fibrolytic Enzymes to Lactating Cow Diets. J. Dairy Sci. 83:2512–2520

บทที่ 3
ผลของการเสริมเอนไซม์ไซแลนเนสต่อการย่อยในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับฟางข้าว
(Effects of xylanase supplementation on ruminal digestibility of fistulated non-lactating dairy cows fed rice straw)

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไซแลนเนสต่อการย่อยสลายและการหมักย่อยในกระเพาะหมักของโคม่ให้นมเจากระเพาะที่ได้รับอาหารที่มีฟางข้าวเป็นอาหารหลัก 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

Abstract

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.

3.1 บทนำ (Introduction)

การย่อยสลายผนังเซลล์ของพืชโดยสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจในประเทศกำลังพัฒนา การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายเยื่อใยโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักได้รับความสนใจศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางมาหลายปีแล้ว ในปัจจุบันงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเสริมเอนไซม์ที่มีสมบัติย่อยสลายเยื่อใยในอาหารโคนมและโคขุน มีศักยภาพในการเพิ่มการใช้ประโยชน์อาหารและเพิ่มผลผลิตสัตว์ สารเสริมเอนไซม์ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยเฉพาะ xylanases และ cellulases เป็นสารเอนไซม์สกัดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียและรา ที่มี specific enzymatic activities การเพิ่มผลผลิตสัตว์เนื่องจากการใช้สารเสริมเอนไซม์เป็นผลมาจากการเพิ่มการย่อยได้เยื่อใยในกระเพาะหมัก ส่งผลให้สัตว์ได้รับ digestible energy เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยส่วนใหญ่ดำเนินการในประเทศเขตอบอุ่นซึ่งอาหารหยาบมีองค์ประกอบของเยื่อใยน้อยกว่าอาหารหยาบในเขตร้อน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ผสม (mixed enzymes) ที่ไม่ทราบปริมาณของเอนไซม์แต่ละชนิด หลายการศึกษารายงานว่าการเสริมส่วนผสมเอนไซม์ย่อยเยื่อใยที่มี xylanase activity สูง มีผลตอบสนองไปในทางบวกในโคขุน (Beauchemin et al., 1997; 1999a) โคนม (Arriola et al., 2011) Xylanases เป็นกลุ่มเอนไซม์ปกติที่พบในกระเพาะหมัก ที่ผลิตขึ้นจากกระบวนการหมักย่อยโดยจุลินทรีย์บางชนิด เป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย xylan polymer ใน plant cell wall ให้เป็น soluble sugars งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินการใช้ single enzyme xylanase ในโคนมที่ไดรับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก ฟางข้าวเป็นผลพลอยได้จากการผลิตข้าวที่มีอยู่มาก และนิยมใช้เป็นอาหารหยาบหลักสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องในประเทศไทยและปรเทศอื่นๆ ที่มีการผลิตข้าว อย่างไรก็ตาม คุณค่าทางโภชนะของฟางข้าวต่ำ มีองค์ประกอบของ lignocellulosic content สูง มีโปรตีนและความน่ากินต่ำ ส่งผลให้สัตว์กินได้น้อย ย่อยเยื่อใยได้น้อยและไม่สมบูรณ์ ทำให้ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์อาหารต่ำ และผลผลิตสัตว์ลดลง งานวิจัยในปัจจุบันหลายงานแสดงให้เห็นว่าการเสริม

exogenous fibrolytic enzymes ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถเพิ่มการย่อยได้วัตถุแห้ง และเยื่อใยได้ (Bowman et al., 2002; Rode et al., 1999 and Yang et al., 2000) นอกจากนี้ Yang et al. (1999) รายงานว่าการย่อยสลาย OM และ NDF ในกระเพาะหมัก และการย่อยได้ OM และ NDF ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นเมื่อโคนมได้รับการเสริม enzyme mixture และการย่อยได้ DM และ OM เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (Beauchemin et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่การศึกษาวิจัยทั้งหมดรายงานการย่อยได้เพิ่มขึ้นเนื่องจากการเสริม exogenous fibrolytic enzymes (Knowlton et al., 2002 and Lewis et al., 1999) และเมื่อพิจารณาถึงการใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ต่างๆ รวมถึงสถานภาพของแต่ละการทดลอง ผลตอบสนองต่อการเสริมเอนไซม์ของสัตว์เคี้ยวเอื้องยังมีความผันแปรอยู่ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะประเมินผลของการใช้เอนไซม์ xylanase (endo-1, 4-beta-xylanase, EC 3.2.1.8) 2 ระดับต่อการย่อยสลายและการหมักย่อยในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับอาหารที่มีฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก

3.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and methods)

3.2.1 สัตว์ทดลอง การจัดกลุ่มการทดลอง และการให้อาหาร (Animal, treatments and feeding)

ใช้โคไม่ให้นมเจาะกระเพาะจำนวน 3 ตัว เลี้ยงดูในคอกขังเดี่ยว และจัดลงในลุ่มการทดลอง 3 กลุ่ม ตามแผนการทดลอง 3 x 3 Latin squares design การทดลองแบ่งเป็น 3 ระยะการทดลอง แต่ละระยะการทดลองใช้เวลา 21 วัน โดย 14 วันแรก เป็นระยะปรับตัว และ 7 วันหลังเป็นระยะที่เก็บตัวอย่าง 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) ผลิตจากกระบวนการหมักของ Trichoderma longibrachiatum (xylanase activity 40000 U/g) โคแต่ละตัวจะได้รับอาหารข้นที่มีโปรตีน 17% วันละ 3 กิโลกรัม แบ่งเป็น 2 มื้อเท่าๆ กัน ในเวลา 0700 และ 1500 และได้รับฟางข้าวเต็มที่ มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา ทำการวัดการกินได้ทุกวัน และคำนวณค่าเฉลี่ยในแต่ละช่วงการทดลอง

3.2.2 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ทางเคมี

ทำการบดตัวอย่างอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร สำหรับการวิเคราะห์ทางเคมี วัตถุแห้งของฟางข้าวและอาหารข้นวิเคราะห์โดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C จนน้ำหนักคงที่ ส่วน nitrogen (N), ether extract (EE) และ ash วิเคราะห์ตามวิธีการที่ระบุไว้ใน AOAC, (1995) ในขณะที่ acid detergent fiber (ADF) และ neutral detergent fiber (NDF) วิเคราะห์ตามวิธีการที่แนะนำโดย Van Soest et al. (1991) บดฟางข้าวผ่านตะแกรงขนาด 2 mm สำหรับการหา in sacco ruminal disappearance ชั่งตัวอย่างฟางข้าวที่ผ่านการบดแล้วประมาณ 5 g บรรจุลงในถุงไนล่อนขนาด 8 x 11 cm ที่มีขนาด pore size 47 μm นำถุงไนล่อนไปจุ่มแช่ในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะเป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 h เมื่อครบกำหนดแต่ละระยะเวลานำถุงไนล่อนออกจากกระเพาะหมัก นำไปล้างในน้ำที่ไหลตลอดเวลา หลังจากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากชั่งน้ำหนักถุงไนล่อนแต่ละถุงแล้ว นำตัวอย่างที่เหลืออยู่ในถุงไปวิเคราะห์หา DM, NDF และ ADF ค่าการย่อยสลาย (degradability values) ได้จากการสูญเสียโภชนะในเวลาต่างๆ โดยใช้ NEWAY EXCEL (Chen, 1996)

เพื่อประเมินกระบวนการหมักในกระเพาะหมัก ในวันที่ 21 ของแต่ละช่วงการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่าง ruminal fluid จากโคเจาะกระเพาะแต่ละตัว ที่เวลา 0, 2, 4 และ 6 h หลังจากการให้อาหารมื้อเช้า ทำการวัดค่า rumen pH ทันทีในเวลาที่เก็บตัวอย่างโดยใช้ pH meter สำหรับการวิเคราะห์ VFAs และ ammonia N นำ rumen fluid ปริมาตร 20 ml บรรจุลงใน test tube ขนาด 25 ml ที่มี 6 N HCl ปริมาตร 5 ml หลังจากนั้นทำการ centrifuge ที่ 1895 rpm เป็นเวลา 15 min นำส่วนของ supernatant บรรจุลงใน test tube ขนาด 25 ml ปิดด้วยจุกฝาเกลียว นำไปเก็บรักษาที่ -20 °C จนกระทั่งวิเคราะห์หา acetic, propionic และ butyric acids โดยใช้เครื่อง GC (Hewlett Packard GC system HP6890, USA, 19091N-113 INNOWAX , Length (meters) 30, I.D. (mm) 0.32 WIDEBORE, Film (um) 0.25) ส่วนความเข้มข้นของ ammonia N วิเคราะห์โดย Kjeldahl analysis (AOAC, 1995)

3.2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

นำข้อมูล DM intake, pH, ammonia N, VFAs และ ruminal disappearance coefficients ในแต่ละช่วงการทดลอง ไปวิเคราะห์สถิติ ANOVA โดยใช้ Statistical Analysis System (SAS, 1996) ความแตกต่างระหว่าง treatment means เปรียบเทียบโดยใช้ Least Significant Differences (Steel and Torrie, 1980)

3.3 ผลการทดลอง (Results)

3.3.1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร การกินได้และการหมักในกระเพาะหมัก

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้นและฟางข้าวที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.1 ค่าเฉลี่ยของ DM, CP, EE, NDF, ADF และ ADL ของอาหารข้นและฟางข้าวมีค่าเท่ากับ 91.33 และ 92.45, 17.23 และ 3.43, 2.65 และ 0.51, 31.29 และ 67.27, 24.06 และ 47.19, 5.51 และ 7.68% ตามลำดับ

การกินได้อาหาร ruminal pH และความเข้มข้นของ ammonia N และ VFAs แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 การกินได้อาหาร (10.27, 10.55 and 10.24 kgDM/d ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากการเสริม xylanase (P>0.05) เอนไซม์ xylanase ไม่ส่งผลต่อ ruminal pH และ ammonia N concentration ในแต่ละเวลาที่ทำการศึกษา (P>0.05) นอกจากนี้ ความเข้มข้นของ total volatile fatty acids, molar proportion of acetate, pripionate และ butyrate และ ratio of acetate: propionate ในแต่ละเวลา ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการเสริม xylanase (P>0.05) (Table 3.3)

Table 3.1 Chemical composition of feeds

Item	Concentrate	Rice straw
	.....% of DM.....	
Dry matter	91.33	92.45
Ash	10.10	15.36
Crude protein	17.23	3.43
Ether extract	2.65	0.51
Neutral detergent fiber	31.29	67.27
Acid detergent fiber	24.06	47.19
Acid detergent lignin	5.51	7.86

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 3.2 Effect of xylanase supplementation onfeed intake, ruminal pH and NH_3-N of fistulated non-lactating dairy cows

Item	Control	10 g xylanase/cow/d	20 g xylanase/cow/d	SEM	P-value
Feed Intake(kg/day)	10.27	10.55	10.24	2.840	0.98
pH					
Hour 0	6.62	6.67	6.71	0.002	0.37
Hour 2	6.61	6.60	6.65	0.003	0.67
Hour 4	6.42	6.48	6.39	0.001	0.24
Hour 6	6.42	6.50	6.37	0.003	0.32
NH_3-N (mg/l)					
Hour 0	25.51	25.45	23.60	2.68	0.57
Hour 2	43.19	43.41	48.41	6.24	0.32
Hour 4	28.14	26.54	33.94	6.92	0.21
Hour 6	17.90	19.02	20.35	2.08	0.44

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 3.3 Effect of xylanase supplementation on volatile fatty acid (VFAs) of fistulated non-lactating dairy cows

Item	Control	10 g xylanase/cow/d	20 g xylanase/cow/d	SEM	P-value
Acetate (C2)		mol/100mol			
Hour 0	75.52	75.07	74.63	1.59	0.82
Hour 2	72.68	72.07	72.54	2.68	0.94
Hour 4	73.05	73.46	73.26	2.71	0.97
Hour 6	73.66	73.31	73.26	2.62	0.97
Propionate (C3)		mol/100mol			
Hour 0	14.47	15.09	14.32	1.70	0.85
Hour 2	15.69	15.69	15.92	1.33	0.98
Hour 4	15.04	15.25	15.26	1.17	0.98
Hour 6	14.52	14.81	14.71	2.11	0.98
Butytate (C4)		mol/100mol			
Hour 0	10.00	10.27	10.60	0.92	0.85
Hour 2	11.63	11.86	11.55	1.51	0.97
Hour 4	11.90	11.26	11.48	1.62	0.90
Hour 6	11.83	11.85	11.88	1.31	1.00
TotalsVFA		mmol			
Hour 0	51.32	51.39	49.46	3.07	0.60
Hour 2	63.78	58.21	65.98	5.67	0.17
Hour 4	65.40	59.88	67.86	5.77	0.18
Hour 6	62.31	58.17	64.98	4.09	0.17
C2:C3					
Hour 0	5.23	4.98	5.25	0.26	0.87
Hour 2	4.65	4.65	4.57	0.16	0.98
Hour 4	4.88	4.82	4.81	0.17	0.98
Hour 6	5.10	4.98	4.93	0.29	0.95

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.2 Ruminal disappearance ของฟางข้าว

In sacco ruminal disappearance ของฟางข้าวแสดงไว้ในตารางที่ 3.4 DM soluble fraction (a), DM potential disappearance fraction (b), DM disappearance rate (c), และ DM total disappearance (a + b) ของฟางข้าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเสริมเอนไซม์ xylanase (P>0.05) นอกจากนี้ การเสริมเอนไซม์ xylanase ไม่ส่งผลต่อ NDF soluble fraction (a) และ NDF disappearance rate (c) ของฟางข้าว (P>0.05) แต่ NDF potential disappearance fraction (b) และ NDF total disappearance (a + b) ของฟางข้าว ในโคเจาะกระเพาะที่ได้รับ 20 g/cow/d xylanase มีค่าสูงกว่าในโคที่ไม่ได้รับ และได้รับ 10 g/cow/d xylanase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่ ADF soluble fraction (a), ADF potential disappearance fraction (b), ADF disappearance rate (c), และ ADF total disappearance (a + b) ของฟางข้าว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง (P>0.05) ตารางที่ 3.5 แสดงผลของ Hemicellulose degradability ที่ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ไม่ได้รับผลกระทบจากการเสริมเอนไซม์ xylanase (P>0.05)

Table 3.4 Effect of xylanase supplementation onruminal disappearance coefficients of rice straw

Item	Control	10 g xylanase/cow/d	20 g xylanase/cow/d	SEM	P-value
Dry matter					
Soluble fraction (a)	9.07	13.10	10.10	1.79	0.19
Potential disappearance (b)	48.80	48.07	53.10	4.63	0.27
Disappearance rate (c)	0.021	0.018	0.018	< 0.01	0.20
a+b	57.87	61.20	63.17	2.88	0.19
Neutral detergent fiber					
Soluble fraction (a)	1.00	1.47	0.97	0.064	0.32
Potential disappearance (b)	57.13[b]	55.63[b]	61.50[a]	0.62	0.04
Disappearance rate (c)	0.023	0.021	0.020	< 0.01	0.16
a+b	57.93[b]	57.10[b]	62.47[a]	0.76	0.04
Acid detergent fiber					
Soluble fraction (a)	0.37	0.97	0.50	0.047	0.21
Potential disappearance (b)	58.23	56.67	59.13	5.32	0.66
Disappearance rate (c)	0.0176	0.0183	0.0176	< 0.01	0.20
a+b	58.57	57.63	59.57	4.56	0.74

[a,b]Means within the same row having different letters are different (P<0.05).

3.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

การเสริมเอนไซม์ xylanase ไม่มีผลต่อการกินได้วัตถุแห้งในการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการเสริมเอนไซม์ไม่ได้เพิ่มการย่อยสลายวัตถุแห้งในกระเพาะหมัก และใช้โคที่ไม่ให้นมซึ่งให้อาหารตามความต้องการเพื่อการดำรงชีพ ผลการทดลองทำนองเดียวกัน (Schingoethe et al., 1999; Kung et al., 2000; Sutton et al., 2003 and Rode et al., 1999) รายงานว่าการกินได้วัตถุแห้งไม่เพิ่มขึ้นจากการเสริมเอนไซม์ Yang et al. (1999) รายงานว่าการกินได้วัตถุแห้งไม่มีผลกระทบจากการเสริมเอนไซม์ ถึงแม้ว่าการย่อยได้เยื่อใยตลอดระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น แต่อัตราการไหลผ่านอาหารไม่ถูกผลกระทบ อย่างไรก็ตาม มีบางรายงานที่พบว่าการกินได้วัตถุแห้งเพิ่มขึ้น Lewis et al. (1999) รายงานว่าการกินได้วัตถุแห้งของโคนมเพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ในพืชอาหารสัตว์ Beauchemin et al. (2004a) เสนอว่า การเสริมเอนไซม์ในรูปของเหลวในอาหารแห้งมีความสำคัญต่อการดูดซึมและการเข้าจับสารอาหารของเอนไซม์ก่อนการให้อาหาร เพื่อให้การเข้าจับเป็นไปอย่างเหมาะสมและป้องกันการย่อยสลายจากกระบวนการย่อยโปรตีนในกระเพาะหมัก ในทางตรงกันข้าม Yang et al. (2000) รายงานว่าการกินได้วัตถุแห้งไม่ถูกกระทบจากการเสริมเอนไซม์ เมื่อทำการเสริมเอนไซม์ในอาหาร TMR ทันทีก่อนการให้อาหาร ดูเหมือนว่าผลของการเสริมเอนไซม์ต่อการกินได้อาหารแตกต่างกันระหว่างชนิดของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ แต่วิธีการเสริมเอนไซม์ในอาหารพบว่าไม่ใช่ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการกินได้อาหาร (Yang et al., 2000) Beauchemin et al. (2003) อธิบายไว้ว่า การเสริม exogenous enzyme จะให้ผลตอบสนองในเชิงบวกในสัตว์ที่ให้ผลผลิตสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ที่ได้รับพลังงานที่ระดับดำรงชีพ

การเสริม xylanase ไม่มีผลต่อระดับ ruminal pH ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสัดส่วนของ total volatile fatty acids ไม่เปลี่ยนแปลง การศึกษาครั้งนี้ ระดับ ruminal pH ใกล้กับระดับ neutral เพราะสัตว์ได้รับฟางข้าวในปริมาณมาก ดูเหมือนว่า exogenous fibrolytic enzymes สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่ ruminal pH เป็นกลาง (Colombatto et al., 2007) ความเข้มข้นของ ruminal ammonia N ในทุกชั่วโมงที่สุ่มเก็บตัวอย่าง ไม่ถูกกระทบจากการเสริมเอนไซม์ xylanase มีรายงานผลทำนองเดียวกัน (Bowman et al., 2002; Sutton et al., 2003; Alvarea et al., 2009 and Yang et al., 1999) ทั้งนี้เพราะว่า ruminal ammonia N เกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน หรือยูเรีย โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก แต่อิทธิพลหลักของการเสริม xylanase คือการเพิ่มการย่อยได้ fiber (xylan) ซึ่งไม่มีผลต่อความเข้มข้นของ ruminal ammonia N ในขณะเดียวกันความเข้มข้นของ ruminal VFA ในแต่ละชั่วโมงที่สุ่มเก็บตัวอย่างไม่แตกต่างกัน เมื่อทำการเสริม xylanase สอดคล้องกับการทดลองของ Yang et al. (1999) และ Kung et al. (2000) ในทางตรงกันข้าม Sutton et al. (2003) รายงานว่า acetate ลดลง propionate เพิ่มขึ้น และ butyrate ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม Yang et al. (2000) รายงานว่า total VFA เพิ่มขึ้น แต่ butyrate ลดลง นอกจากนี้ การเสริม xylanase ที่มี 135 xylanase units ต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ

total VFA เมื่อโคได้รับ fescue hay-based diet แต่ไม่ทำให้อัตราส่วน acetate: propionate (A:P) เปลี่ยนแปลง (Tricarico and Dawson, 2005)

การย่อยได้ของ DM, ADF และ hemicellulose ไม่มีผลกระทบจากการเสริม xylanase เพราะว่าการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์เดี่ยว คือ xylanase การเสริม xylanase ที่ระดับ 20 g/cow/d สามารถเพิ่ม potential disappearance fraction (b) และ total disappearance (a + b) ของ NDF ในฟางข้าว ได้มากว่าการเสริม xylanase ที่ระดับ 0 และ 10 g/cow/d ทั้งนี้ Bowman et al. (2002) รายงานว่า การย่อยได้ของ DM, OM, NDF และ ADF เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ในอาหารข้น เพราะว่าใช้ส่วนผสมของเอนไซม์หลายชนิดในการทดลอง การเสริมส่วนผสมของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมของ xylanase และ endoglucanase โดยปกติจะมีผลมากกว่าการเสริมเอนไซม์ชนิดเดียว (Tricarico and Dawson, 2005) นอกจากนี้ Rode et al. (1999) รายงานว่าการย่อยได้โภชนะตลอดระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ในอาหารข้นที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร TMR ในขณะที่ Beauchemin et al. (1999b) รายงานว่าการเสริมเอนไซม์ในอาหาร TMR ก่อนให้อาหารจะเพิ่มการย่อยได้ตลอดทางเดินอาหาร มีข้อแนะนำว่าการเสริมเอนไซม์ในอาหาร TMR ทันทีก่อนให้อาหาร จะทำให้เอนไซม์ละลายผสมใน ruminal fluid ส่งผลให้มีการไหลผ่านของเอนไซม์อย่างรวดเร็วจากกระเพาะหมักไปยังกระเพาะส่วนล่าง ทำให้การทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในกระเพาะส่วนล่าง (Yang et al., 2000)

ผลิตภัณฑ์เอนไซม์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น cellulase และ hemicellulase ซึ่งผลิตจากรา อาทิ Trichoderma longibrachiatum, Aspergilus niger, A. oryzae) และแบคทีเรีย Bacillus spp (Beauchemin et al., 2004b) นอกจากนี้ จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ hemicellulose หรือ xylanase ได้ เช่นแบคทีเรีย Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens, Butyrivibrio fibrisolvens และ Bacteroides ruminicola (Hespell, 1988) รา Neocallimastix frontalis (Mountfort and Asher, 1989) อย่างไรก็ตาม หลายๆ การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเสริม direct-fed microbials ที่มีจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ จะมีเอนไซม์อยู่ด้วย แต่มีความเข้มข้นน้อยกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองอื่นๆ ชนิดและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมีความผันแปร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ และสภาวะของการเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์ (Beauchemin et al., 2004b) งานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถประเมินผลผลิตสัตว์ได้ ถึงแม้ว่าการเสริม xylanase จะเพิ่มการย่อยได้ NDF ทั้งนี้เพราะว่างานวิจัยนี้ไม่ได้ทดลองในสัตว์ที่ให้ผลผลิต ผลตอบสนองต่อการเสริมเอนไซม์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ กิจกรรมของเอนไซม์ ชนิดและปริมาณการเสริม ชนิดของอาหาร วิธีการเสริมเอนไซม์ และสภาวะทางสรีรวิทยาของตัวสัตว์ (Beauchemin et al., 2003)

3.5 สรุป

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเอนไซม์ชนิดเดียว คือ xylanase (endo-1, 4-beta-xylanase) มี activity 40000 U/g เมื่อเสริมในโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะไม่ส่งผลต่อการกินได้อาหาร ระดับ pH, NH_3-N และ VFA ในกระเพาะหมัก การเสริม xylanase ไม่มีผลกระทบต่อ DM และ ADF potential disappearance fraction, และ DM และ ADF total disappearance อย่างไรก็ตาม การเสริม xylanase ในระดับสูง สามารถเพิ่ม NDF potential disappearance fraction และ NDF total disappearance งานวิจัยต่อไปควรศึกษาถึงส่วนผสมของเอนไซม์หลายชนิด และระดับการเสริมที่เหมาะสม ควรศึกษาระดับการใช้ที่ต่ำที่สุด ที่สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใย เพื่อลดต้นทุนของการใช้เอนไซม์

เอกสารอ้างอิง

Alvarez, G., Pinos-Rodriguez, J.M., Herrera, J.G., Garcia, J.C., Gonzalez, S.S., Barcena, R., 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. Livestock Science. 121, 150–154.

Arriola, K. G., Kim, S. C., Staples,C. R., Adesogan, A. T., 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 94, 832-841.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.

Beauchemin, K. A., Jones, S. D. M., Rode, L. M., Sewalt, V. J. H., 1997. Effects of fibrolytic enzymes in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. Can. J. Anim. Sci. 77: 645–653.

Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Karren, D., 1999a. Use of feed enzymes in feedlot finishing diets. Can. J. Anim. Sci. 79, 243–246.

Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Rode, L. M., 1999b. Effect of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 378–390.

Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Maekawa, M., Morgavi, D. P., Kampen, R., 2000. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. J. Dairy Sci. 83, 543–553.

Beauchemin, K. A., Colombatto, D. Morgavi, D. P. and Yang, W. Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81: (E. Suppl.): E37–E47.

Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z., Rode, L. M., 2004a. Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84, 13–22.

Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., 2004b. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84, 23-36.

Bowman, G. R., Beauchemin, K. A., Shelford, J. A., 2002. The proportion of the diet to which firbolytic enzyme are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85, 3420 – 3429.

Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Owen, E., 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzyme level and incubation pH on the in vitro ruminal fermentation of alfalfa stems. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 150–162.

Chen, X.B., 1996. An Excel Application Programme for Processing Feed Digestibility Data. User Manual, Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK.

Hespell, R.B., 1988. Microbial digestion of hemicelloses in the rumen. Microbiological Sciences. 5, 362-365.

Knowlton, K. F., McKinney, J. M., Cobb, C., 2002. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation holstein cows. J. Dairy Sci. 85, 3328–3335.

Kung, L. Jr., Treacher, R. J., Nauman, G. A., Smagala, A. M., Endres, K. M., Cohen, M. A., 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 83, 115–122.

Lewis, G. E., Sanchez, W. K., Hunt, C. W., Guy, M. A., Pritchard, G. T., Swanson, B. I., Treacher, R., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 611–617.

Rode, L. M., Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 82, 2121–2126.

Schingoethe, D. J., Stegeman, G. A., Treacher, R. J., 1999. Response of Lactating Dairy Cows to a Cellulase and Xylanase Enzyme Mixture Applied to Forages at the Time of Feeding. J. Dairy Sci. 82, 996–1003.

Statistical Analysis System. 1996. SAS User' Guide: Statistics. NC: SAS Institute.

Steel, R. G. D., Torries, J. H., 1980. Principles and procedures of statistics: a biometeric approach (2 nd Ed). McGrowHill: New York.

Sutton, J. D., Phipps, R. H., Beever, D. E., Humphries, D. J., Hartnell, G. F., Vicini, J. L., Hard, D. L., 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-friesian cows. J. Dairy Sci. 86, 546–556.

Tricarico, J.M., Dawson, K. A., 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal in vitro cultures. Arch. Anim. Nutr. 59(5), 325-334.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal production. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.

Yang, W. Z., Beauchemin, K. A., Rode, L., 1999. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 391–403.

Yang, W. Z., Beauchemin. K. A., Rode, L. M., 2000. A Comparison of Methods of Adding Fibrolytic Enzymes to Lactating Cow Diets. J. Dairy Sci. 83, 2512–2520.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
การใช้ fibrolytic enzymes additives เพื่อเพิ่มการหมักย่อย in vitro ในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก
(Use of fibrolytic enzymes additives to enhance *in vitro* ruminal fermentation of corn silage)

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดลอง 2 การทดลองเพื่อประเมินผลของสารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก โดยใช้ 48 h batch culture in vitro assay ร่วมกับสารบัฟเฟอร์และ ruminal fluid ดำเนินการทดลองที่ 1 (Exp. 1) และการทดลองที่ 2 (Exp. 2) โดยใช้แผนการทดลอง completely randomized design และในแต่ละการทดลองประกอบด้วย 2 run 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 เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามระดับการ

เสริมที่เพิ่มขึ้น 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≤0.05) 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 ผลตอบสนองต่อการเพิ่มระดับการเสริมจะเป็นแบบ linear หรือ curvilinear และระดับการเสริมที่เหมาะสมจะแตกต่างกันระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ทำการประเมิน การประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ปกติจะนำไปสู่การจัดอันดับของผลิตภัณฑ์สารเสริม และการย่อยสลายของ NDF และ ADF จะมีประโยชน์ในการจำแนกประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ดีกว่าการย่อยสลาย DM และ total GP

Abstract

Two 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≤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

4.1 บทนำ

Fibrolytic enzyme feed additives มีศักยภาพในการเพิ่มการย่อยได้เยื่อใยและประสิทธิภาพการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้อง พืชอาหารสัตว์มีองค์ประกอบของเยื่อใยอยู่สูง ซึ่งจะจำกัดการกินได้และการย่อยได้อาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Jung and Allen, 1995) จุลินทรีย์ในกระเพาะหมักสามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยเยื่อใย แต่ผนังเซลล์มีโครงสร้างที่ซับซ้อนและการที่พืชอาหารสัตว์มีระยะเวลาอยู่ในกระเพาะหมักจำกัด ทำให้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ย่อยเยื่อใยได้น้อย (Wang and McAllister, 2002) การศึกษามากมายที่ประเมินผลการใช้ fibrolytic enzyme additives เพื่อขจัดข้อจำกัดเหล่านี้

(Beauchemin et al., 2003) โดยงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการใช้เอนไซม์ cellulases และ xylanases ที่ย่อยสลาย cellulose และ hemicellulose ตามลำดับ

การเสริม fibrolytic enzyme additives สามารถเพิ่ม in vitro fiber digestion และเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของทั้งพืชอาหารสัตว์คุณภาพต่ำ (Yang and Xie, 2010) และคุณภาพสูง (Eun et al., 2007) Eun and Beauchemin (2007) และ Eun et al. (2007) ใช้ alfalfa และ corn silage เป็น substrate รายงานว่า การเสริมเอนไซม์เพิ่มการย่อยได้ DM และเยื่อใย เมื่อศึกษาในห้องปฏิบัติการ และได้ผลทำนองเดียวกันใน continuous culture (Colombatto et al., 2003) และในตัวสัตว์ (Rode et al., 1999; Yang et al., 2000) ในการศึกษาที่ใช้ grass hay: concentrate (600:400 g/kg DM) เป็น substrate การเสริม fibrolytic enzymes เพิ่ม total bacterial numbers (Giraldo et al., 2007) และ cellulolytic bacteria เพิ่มขึ้นใน rumen simulation (i.e., Rusitec) fermenters โดยใช้ barley grain และ alfalfa hay เป็น substrates (Wang et al., 2001) การศึกษษในตัวสัตว์ ให้ผลตอบสนองในเชิงบวกเช่นเดียวกัน เมื่อเสริม fibrolytic enzymes ให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Arriola et al., 2011; Holtshausen et al., 2011) ถึงแม้ว่าในบางการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลในเชิงบวกเมื่อเสริม fibrolytic enzymes ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง แต่ก็มีหลายการศึกษาที่ให้ผลไม่ตรงกัน หรือไม่มีผลกระทบต่อ in vivo digestibility หรือต่อผลผลิตสัตว์ (Knowlton et al., 2002;Lewis et al., 1999;Vicini et al., 2003) มีข้อแนะนำว่าสารเสริมเอนไซม์มีประสิทธิภาพผันแปรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น กิจกรรมของเอนไซม์ ชนิดและระดับการใช้เอนไซม์ ชนิดของอาหาร วิธีการเสริมเอนไซม์ และสถานะทางสรีรวิทยาของสัตว์ (Beauchemin et al., 2003) ดังนั้นข้อจำกัดหลักของการใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทางการค้าที่แพร่หลายสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องคือความไม่แน่นอนของประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอนไซม์ รวมทั้งความผันแปรของผลตอบสนองของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารและการจัดการการให้อาหาร ยังไม่สามารถที่จะทำนายถึงศักยภาพของการใช้เอนไซม์จากคุณสมบัติทางชีวเคมีเพียงอย่างเดียว (Beauchemin et al., 2004) ดังนั้นการทดลอง in vitro bioassay ที่จำลองสภาวะของกระเพาะหมักจะเป็นประโยชน์ในการที่จะจำแนกประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปใช้ทดลองในสัตว์ต่อไป (Beauchemin et al., 2004)

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการใช้ต้นข้าวโพดหมัก เพราะมีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก และมีคุณค่าทางโภชนะสูง ในขณะที่การศึกษาที่ผ่านมาได้ประเมินผลของการเสริมเอนไซม์โดยใช้อาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบพื้นฐาน (e.g., Arriola et al., 2011) ผลการทดลองยังไม่ชัดเจนว่ากิจกรรมของเอนไซม์และระดับการใช้ใดมีประสิทธิภาพสูงสุด มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาหาระดับของการเสริมที่เหมาะสมของสารเสริมเอนไซม์ชนิดนั้นๆ เพราะระดับการเสริมมีผลต่อความคุ้มทุนของการเสริมเอนไซม์ในโคนมเพื่อเพิ่มการย่อยได้อาหารหยาบ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพและระดับการเสริมสารเสริมเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ต้นข้าวโพดหมักเป็น substrate วิธีการที่ใช้ประกอบการประเมิน คือ in vitro batch culture ที่ 24 และ

48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาถึงผลของการใช้สารเสริมเอนไซม์ทางการค้า 4 ชนิด ต่อการย่อยสลายและรูปแบบการหมักย่อยในกระเพาะหมักของต้นข้าวโพดหมัก

4.2 อุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ดำเนินการโดยใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 2 runs (batches) และแต่ละ batch มี 4 ซ้ำ (replicates per run) รวมมีกลุ่มการทดลอง 16 กลุ่มการทดลอง โดยจัดกลุ่มการทดลองเป็นแบบ factorial ประกอบด้วยสารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด และระดับการเสริม 4 ระดับ *การทดลองที่ 2* ใช้แผนการทดลองเช่นเดียวกัน แต่มีกลุ่มการทดลอง 20 กลุ่มการทดลอง โดยจัดกลุ่มการทดลองเป็นแบบ factorial ประกอบด้วยสารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด และระดับการเสริม 5 ระดับ ทั้งสองการทดลอง การทำแต่ละ batch ทำแยกกันคนละวัน แต่ใช้สารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิดเหมือนกัน และใช้ต้นข้าวโพดหมักเป็น substrate เช่นเดียวกัน

4.2.1 Substrate และผลิตภัณฑ์เอนไซม์

ใช้ต้นข้าวโพดหมักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (neutral detergent fiber [NDF], 39.82%; acid detergent fiber [ADF], 19.08%; DM basis) เป็น substrate ใช้สารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด ซึ่งเป็นส่วนผสมของ Cellulase Plus และ Xylanase Plus ในสัดส่วน 75:25 (E1; ผลิตจากจุลินทรีย์ Trichoderma longibrachiatum; Dyadic International, Florida, USA); Rovabio Excel LC2 (E2; ผลิตจากจุลินทรีย์ Penicillium funiculosum; Adisseo France SAS, Antony, France); Rovabio Rips (E3; ผลิตจากจุลินทรีย์ P. funiculosum; Adisseo France SAS, Antony, France), and Econase RDE (E4; ผลิตจากจุลินทรีย์ T. longibrachiatum; AB Vista, Marlborough, UK) เอนไซม์ E1 จากชุดการผลิตเดียวกัน (3.4 mg/g of total mixed ration DM; corn silage and alfalfa hay เป็นอาหารหยาบหลัก) สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใย และประสิทธิภาพการผลิตน้ำนม เมื่อเสริมให้กับโคนม (Arriola et al., 2011) ทำนองเดียวกัน เอนไซม์ E4 จากชุดการผลิตเดียวกันได้ทำการทดลอง (0.5 และ 1.0 ml/kg of total mixed ration DM; อาหารหยาบได้แก่ barley silage, alfalfa silage, และ alfalfa hay) ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามระดับการเสริมเอนไซม์ (Holtshausen et al., 2011) เอนไซม์ E2 เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ในสัตว์กระเพาะเดี่ยว ในขณะที่เอนไซม์ E3 เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่อยู่ในระหว่างการทดลอง ยังไม่ได้จำหน่ายเป็นการค้า เอนไซม์ E2 และ E3 ยังไม่เคยทดสอบทั้งในห้องปฏิบัติการและในตัวสัตว์เคี้ยวเอื้อง

4.2.2 การหมักย่อยในห้องปฏิบัติการ (In vitro fermentations)

4.2.2.1 การทดลองที่ 1

ทำการทดลองโดยใช้วิธี in vitro batch culture assay และใช้ rmen fluid เป็น inoculum ทำการบด substrate ซึ่งเป็นต้นข้าวโพดหมัก ผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. นำตัวอย่างต้นข้าวโพดบดประมาณ 0.9 g DM บรรจุลงในถุงไนล่อน (F57, Ankom Technology, Macedon, NY) ที่ผ่านการ

ล้างด้วย acetone และชั่งน้ำหนักถุงเปล่าแล้ว ในแต่ละกลุ่มการทดลองและในแต่ละระยะเวลาบ่ม ประกอบด้วย 4 ซ้ำ เจือจางผลิตภัณฑ์เอนไซม์ด้วยน้ำ และเติมส่วนผสม (200μl) ลงบน substrate ในถุงไนล่อน ก่อนการปิดผนึกปากถุง ที่ 4 ระดับ ของแต่ละเอนไซม์ กล่าวคือ 0 (control), 2, 4 and 8μl/g of substrate DM ทำการปิดปากถุงด้วยความร้อน นำถุงไนล่อนบรรจุลงในขวดปริมาตร 125 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม. ทำการเก็บ rumen fluid จากโคเจาะกระเพาะจำนวน 3 ตัว หลังการให้อาหารเช้า 3 ชม. กรองผ่าน cheesecloth 4 ชั้น ลงใน flask ที่ flush ด้วย oxygen-free CO_2 ถ่าย rumen fluid ลงใน insulated flask แล้วรีบนำไปห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชม. หลังการเก็บตัวอย่าง เติม anaerobic buffer medium (60 ml; Goering and Van Soest, 1970) ที่ประกอบด้วย tryptone, buffer, macro และ micro mineral solution, resazurin และน้ำ ปรับ pH ที่ 6.0 โดยใช้ 1 M trans-aconitic acid (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) ระดับ pH ที่เลือกเป็นระดับที่เป็นตัวแทนของค่าเฉลี่ย pH ในกระเพาะหมักของโคนม นอกเหนือจากสารละลาย buffer เติม rumen fluid (15 ml) ลงในแต่ละขวด ในอัตราส่วน 1:4 (rumen fluid: anaerobic buffer medium) ภายใต้สภาวะที่ flush ด้วย CO_2 อย่างต่อเนื่อง ปิดขวดด้วยจุกยาง และจุกอะลูมิเนียม ทันที หลังจากเติมส่วนต่างๆ นำขวดไปบ่มที่อุณหภูมิ 39°C บนเครื่อง rotary shaker เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ทำการบ่ม negative controls (rumen fluid plus anaerobic buffer medium) และ blanks (filter bags plus anaerobic buffer medium and rumen fluid) ด้วย จำนวน 4 ซ้ำ เพื่อปรับใช้ค่า gas production และ disappearance ตามลำดับ ทำการวัด head space gas production (GP) resultant of substrate fermentation ที่ระยะเวลาบ่ม 3, 6, 12, 18, 24, และ 48 ชม. ทำการวัด GP was โดยการสอดเข็มขนาด 23 gauge (0.6 mm) ที่มี pressure transducer ที่เชื่อมต่อกับจอภาพ หลังจากบ่มที่ 24 และ 48 ชม. นำขวด กลุ่มการทดลองละ 4 ขวด ออกจากตู้บ่ม วัด gas pressure หลังจากนั้นนำขวดวางบนน้ำเย็นเพื่อหยุดกระบวนการหมัก นำ filter bags (n=4 แต่ละระยะเวลา และแต่ละกลุ่มการทดลอง) ออกจากขวด ล้างถุงผ่านน้ำเย็นไหลจนกระทั่งน้ำใส คำนวณ gas volume จาก gas pressure โดยใช้สมการที่รายงานโดย by Mauricio et al. (1999) ดังนี้

$$\text{Gas volume} = 0.18 + (3.697 \times \text{gas pressure}) + (0.0824 \times \text{gas pressure}^2)$$

ผลผลิตแก๊สสะสมทั้งหมด (Total cumulative gas production; TGP, ml) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง คำนวณโดยการรวมผลบวกปริมาตรแก๊สที่ทำการวัดในแต่ละเวลา ทำการวัดระดับ pH ทันทีด้วย pH-meter เติมตัวอย่าง rumen fluid ลงใน 1 ml ของ 25% meta-phosphoric acid สำหรับนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ volatile fatty acid (VFA) (เฉพาะ Run 1) นำถุงที่ล้างแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณ DM disappearance (DMD) จากการสูญเสีย DM จากถุงไนล่อน นำส่วนที่เหลือในถุงไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ NDF และ ADF คำนวณ NDF และ ADF disappearance (NDFD and ADFD)

4.2.2.2. การทดลองที่ 2

วัตถุประสงค์ของการทดลองที่ 2 เพื่อยืนยันระดับของสารเสริมเอนไซม์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 ดังนั้นจะใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ชนิดเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และใช้ต้นข้าวโพดหมักเหมือนกัน อย่างไรก็ตาม ใช้ช่วงของระดับการเสริมสารเสริมเอนไซม์ที่แคบลง (0, 0.5, 1.0, 2.0, และ 4.0μl/g of substrate DM) แบบแผนการทดลองเป็นเช่นเดียวกันกับที่อธิบายไว้ในการทดลองที่ 1 ยกเว้น VFA ที่วิเคราะห์หาจากตัวอย่างทั้ง 2 runs

4.2.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์ NDF และ ADF ตามลำดับโดยใช้ ANKOM200 Fiber analyzer unit ตามวิธีการที่อธิบายไว้โดย Van Soest et al. (1991) ในการวิเคราะห์ NDF ใช้ sodium sulfite (10 g/l NDF solution) และ heat-stable bacterial amylase (2 ml/l NDF solution) ทำการวิเคราะห์ VFA โดยใช้เครื่อง gas chromatograph (model 5890, Hewlett-Packard Lab, Palo Alto, CA) และ capillary column (30 m x 0.32 mm i.d., 1μm phase thickness, Zebron ZB-FAAP, Phenomenex, Torrance, CA), และ detector ชนิด flame อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 150°C (no hold time), หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นในอัตรา 20°C/min จนถึง 210°C และคงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิของ injector และ detector เท่ากับ 225°C และ 250°C ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็น carrier

วิเคราะห์ activities ต่างๆ ของสารเสริมเอนไซม์ ได้แก่ endoglucanase, exoglucanase, xylanase และ α-amylase activities ตามวิธีการที่แนะนำโดย Colombatto and Beauchemin (2003) สำหรับ substrate ที่ใช้ประกอบด้วย medium-viscosity carboxymethylcellulose (Catalog no. C-5678), cellulose (Sigmacell Cellulose; Catalog no. S-3504), xylan (oat spelt, Catalog no. X-0627; birch wood, Catalog no. X-0502), และ starch (Catalog no. S-3504) ซึ่ง substrate ทั้งหมดนี้ได้จาก Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) สถานะของการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิ 39°C และ pH 6.0 เพื่อสะท้อนสภาวะค่าเฉลี่ย pH ในกระเพาะหมักของโคนม เติมสารละลาย substrate เจือจาง 1% (1.0 ml) และ 0.1 M citrate phosphate buffer (0.9 ml) ลงในหลอดทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ และอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 39°C ปฏิกิริยาจะเริ่มเมื่อเติมสารละลายเอนไซม์เจือจางที่อุ่นแล้ว (diluted in buffer) ทำการบ่มต่อเนื่องที่ระยะเวลาแน่นอน 15, 120, 5, และ 10 นาที สำหรับเอนไซม์ endoglucanase, exoglucanase, xylanase, และ α-amylase ตามลำดับ หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 3,5-dinitrosalicylic acid ปริมาตร 3.0 ml

เตรียม substrate blanks (triplicate) โดยการเติม substrate เจือจางปริมาตร 1 ml สารละลาย buffer ปริมาตร 0.9 ml และน้ำกลั่นปริมาตร 0.1 ml เตรียม enzyme blanks โดยเติมเอนไซม์เจือจางปริมาตร 0.1 ml สารละลาย buffer ปริมาตร 0.9 ml และน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 ml หลังจากทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย dinitrosalicylic acid ปิดขวดด้วยจุกหินอ่อน และต้มอีก 5 นาที ใน

water bath การหา enzymatic activity ทำได้โดยการถ่าย reaction contents ปริมาตร 200μl จำนวน 2 ซ้ำ ลงใน microtiter plate และอ่านค่า absorbance ที่ 544 nm เทียบกับ glucose หรือ xylose standards (จาก 0 ถึง 1 mg) กระบวนการนี้ต้องดำเนินการภายใต้สภาวะที่เหมือนกัน รายงาน enzyme activities ในหน่วย μmol ของ reducing sugar released/ min ml^{-1}

.4.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ mixed model procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองที่ 1 และ 2 แยกกัน ตามแบบแผนการทดลอง completely randomized design (CRD) โดยใช้ enzyme additive, dose และ interaction ในโมเดลเป็น fixed effects ในขณะที่ ภายในการทดลองใช้ run เป็น random effect เมื่อ interaction ระหว่าง enzyme และ dose มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทำการวิเคราะห์แนวโน้มโดย contrasts และ orthogonal polynomial contrasts เพื่อหาผลตอบสนองแบบ linear, quadratic และ cubic ต่อระดับการเสริมระหว่างชนิดของเอนไซม์ เมื่อ main effect ของระดับการเสริมมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) หาผลตอบสนองแบบ linear, quadratic และ cubic ต่อระดับของการเสริมเอนไซม์ด้วยวิธี contrasts และ orthogonal polynomial contrasts กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

4.3 ผลการทดลอง

4.3.1 Enzyme activity

สารเสริมเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดมี xylanase, endoglucanase และ exoglucanase activity มีเพียงเอนไซม์ E2 และ E4 ที่มี amylase activity (Table 4.1) สามารถจัดลำดับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ โดยพิจารณาจาก endoglucanase และ xylanase activity ได้ดังนี้ E4>E1>E2>E3 ไม่ว่าจะใช้ xylan substrate ชนิดใด (i.e.,oatspelt versus birch wood) ดังนั้น ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นของ xylanase และ endoglucanase สูงสุด ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด มีความสัมพันธ์ระหว่าง xylanase โดยใช้ oat spelt หรือ birch wood มาก strong (Pearson correlation coefficient = 0.98) แต่ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1, E2 และ E3 มี xylanase activity สูงกว่าเมื่อใช้ oat spelt เป็น substrate ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 มี xylanase activity สูงกว่าเมื่อใช้ birch wood ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ E1 มี exoglucanase activity, สูงที่สุด ในขณะที่ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ E3 มี exoglucanase activity น้อยที่สุด

4.3.2 การทดลองที่ 1

หลังจากบ่ม 24 ชม. ไม่พบความแตกต่าง ($P>0.05$) ระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์ ของ DMD หรือ TGP แต่พบความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์ ($P<0.05$) ของ NDFD และ ADFD (Table 4.2) ส่วนหลังการบ่ม 48 ชม. นอกจากผลิตภัณฑ์เอนไซม์จะมีผลต่อ NDFD และ ADFD ยังมีผลแตกต่าง

(P¼0.04) ต่อ DMD ถึงแม้ว่า TGP จะเท่ากันในทุกผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (P>0.05) ที่ระยะเวลาบ่มทั้งสอง ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E2 มีผลทำให้ NDFD และ ADFD สูงกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 and E4 (P<0.05) ผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์และระดับการเสริมจะมีผลชัดเจนต่อ fiber fractions มากกว่า DM ทั้งสองระยะเวลาบ่ม ผลของระดับการเสริมต่อ NDFD และ ADFD ขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ (enzyme x dose interactions, P≤0.01) สำหรับเอนไซม์ E1 ผลตอบสนองต่อระดับการเสริมเป็นแบบ linear และ quadratic (linear เฉพาะ ADFD ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม.) โดยมี NDFD และ ADFD สูงสุดที่ระดับการเสริมสูงสุด ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ส่วนเอนไซม์ E2 ผลตอบสนองต่อระดับการเสริมเป็นแบบ linear, quadratic และ cubic (linear และ quadratic เฉพาะ NDFD ที่ 24 ชม.) ดังนั้น ที่ระยะเวลาบ่มทั้งสองเวลา ระดับการเสริมทุกระดับสามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD เมื่อเปรียบเทียบกับ control (P<0.05) โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับการเสริมแต่ละระดับ (P>0.05) สำหรับเอนไซม์ E3 ผลตอบสนองต่อ NDFD และ ADFD ของระดับการเสริมเป็นแบบ linear และ quadratic หลังจากการบ่ม 24 ชม. และเป็นเฉพาะแบบ linear หลังการบ่ม 48 ชม. ผลจากที่กล่าวมาสรุปได้ว่า ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 ระยะเวลา ทุกระดับการเสริมเอนไซม์ สามารถเพิ่ม NDFD เปรียบเทียบกับ control โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างระดับการเสริม แต่ ADFD เพิ่มขึ้นเฉพาะระดับการเสริม 4 และ 8μl/g DM เปรียบเทียบกับ control สำหรับเอนไซม์ E4 ผลตอบสนองของ NDFD และ ADFD ต่อระดับการเสริมเป็นแบบ linear (และ cubic สำหรับ NDFD) หลังจากการบ่ม 24 ชม. โดยทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม NDFD เปรียบเทียบกับ control โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับการเสริม (P>0.05) อย่างไรก็ตาม มีเพียงระดับการเสริมสูงสุดที่สามารถเพิ่ม ADFD หลังการบ่ม 24 ชม. (P<0.05) ส่วนหลังจากการบ่ม 48 ชม. ผลตอบสนองต่อระดับการเสริมของเอนไซม์ E4 สำหรับ NDFD เป็นแบบ quadratic โดยระดับการเสริมที่ 2 และ 4μl/g DM จะสูงกว่า (P<0.05) control แต่ระดับการเสริมที่สูงสุด (8μl/g DM) จะเท่ากับ control (P>0.05) หลังจากการบ่มที่ 48 ชม. ADFD จะเหมือนกัน (P>0.05) สำหรับทุกระดับการเสริมเอนไซม์ E4 เปรียบเทียบกับ control

สำหรับ TGP ไม่พบ enzyme x dose interaction (P≥0.97) ทั้งหลังจากการบ่มที่ 24 หรือ 48 ชม. (Table 4.2) หลังจากการบ่มที่ 24 ชม. ทุกระดับการเสริมส่งผลให้ TGP สูงกว่า control โดยระดับการเสริมที่ 2, 4, และ 8μl/g DM จะมี TGP เหมือนกัน หลังจากการบ่มที่ 48 ชม.ผลตอบสนองต่อ TGP ของระดับการเสริมเป็นแบบ linear และ quadratic โดยมี TGP สูงกว่า ที่ระดับการเสริมที่ 4 และ 8μl/g DM ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทุกชนิดแสดงรูปแบบของ GP rate (ml/h) เหมือนกัน ตลอดระยะเวลาบ่ม 48 ชม. GP rate จะสูงที่สุดที่ระยะเริ่มต้นการหมักย่อย โดยจะมี GP rate สูงสุดที่ 3 ชม. (ไม่ได้แสดงข้อมูล) rate ของ GP ต่ำสุดในกลุ่ม control ที่ 3 ชม. และเมื่อสิ้นสุดระยะการบ่ม

หลังการบ่มที่ 24 ชม. ทั้งชนิดของเอนไซม์และระดับการเสริม ไม่มีผลกระทบ (P>0.05) ต่อ total VFA (Table 4.3) ผลของระดับการเสริมต่อ molar proportion ของ acetate ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเสริมเอนไซม์ (enzyme x dose interaction, P=0.04) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control การ

เสริมเอนไซม์ไม่มีผลต่อ acetate proportion สำหรับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1, E2, และ E3 แต่ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 ที่ระดับการเสริม 4 และ 8μl/g DM ลด acetate proportion เปรียบเทียบกับระดับการเสริมที่ 0 และ 2μl/g DM ดังนั้นค่าเฉลี่ยของ acetate proportions ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 จะต่ำกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกันหลังจากการบ่ม 24 ชม. molar proportion ของ propionate ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 และ E2 จะสูงกว่า (P<0.05) E1 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 จะอยู่ที่ปานกลาง ดังนั้นสัดส่วน acetate ต่อ propionate ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 จะสูงที่สุด (P<0.05) เอนไซม์ E3 ปานกลาง ตามด้วยเอนไซม์ E2 และเอนไซม์ E4 ต่ำที่สุด ผลของระดับการเสริมต่อสัดส่วน acetate ต่อ propionate หลังจากการบ่มที่ 24 ชม. จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ (enzyme x dose interaction, P=0.008) สัดส่วนของ acetate ต่อ propionate ลดลงเป็นเส้นตรงตามระดับของการเสริมเอนไซม์ สำหรับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 และ E4 ในขณะที่ผลตอบสนองต่อเอนไซม์ E1 เป็นแบบ cubic และไม่มีผลตอบสนองของเอนไซม์ E2 หลังจากการบ่มที่ 48 ชม. สารเสริมเอนไซม์มีผลกระทบ (P=0.03) ต่อ total VFA แต่มีแนวโน้มที่จะมีผลต่อความเข้มข้นของ propionate (P=0.07) และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate (P=0.08) (Table 4.3) ดังนั้น ผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ต่อ total VFA จะเด่นชัดหลังจากการบ่ม 48 ชม. มากกว่า 24 ชม. แต่ผลจะเป็นไปในทางตรงกันข้ามสำหรับ molar proportion ของ VFA ความเข้มข้นของ total VFA ของเอนไซม์ E3 และ E4 จะมากกว่า (P<0.05) E2 ในขณะที่ E1 จะปานกลาง (P>0.05) ส่วนระดับของการเสริมไม่มีผล (P>0.05) ต่อ total VFA, molar proportion ของ VFA แต่ละชนิด หรือสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate (P>0.05) ถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้ม (P=0.08) ที่ความเข้มข้นของ propionate จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการเสริมเพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 4.1 Enzyme activity of the four enzyme additives used

Product	Enzymatic activity[2]				
	Xylanase		Endo-glucanase	Exo-glucanase	Amylase
	Oat spelt	Birch wood			
E1	1804±26	1721±21	352±5.9	13.9±0.74	-
E2	1372±70	1172±31	159±5.2	8.9±0.05	0.29
E3	616±51	575±11	59±2.5	3.3±0.10	-
E4	3034±41	3979±10	360±16.3	9.3±0.16	0.37

[1] E1: 75:25 combination of Cellulase PLUS and Xylanase PLUS (Dyadic International, Florida, USA); E2: Rovabio Excel LC2 (Adisseo USA Inc, Georgia, USA); E4: Cinabio (Adisseo USA Inc, Georgia, USA), and E4: Econase RDE (AB Vista, Marlborough, UK).

[2] Endoglucanase, exoglucanase and amylase activity were expressed as μmoles of glucose released per minute per milliliter enzyme. Xylanase activity was expressed as μmoles of xylose released per minute per milliliter enzyme.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Table 4.2 Effect of enzyme (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (experiment 1.1) (N= 8)

Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP (ml/ g DM)	Degradability (%)			Total GP (ml/ g DM)
		DM	NDF	ADF		DM	NDF	ADF	
E1	Mean	48.8	19.5^{A}	12.6^{A}	84.7	57.4^{A}	25.6^{A}	18.0^{A}	118.7
	0	46.9	16.7^{c}	8.9^{c}	79.6	56.6	22.7^{c}	14.5^{c}	107.5
	2	48.7	19.5^{b}	13.0^{b}	84.8	57.0	25.6^{b}	17.4^{b}	119.4
	4	50.3	20.2^{b}	13.4^{b}	86.8	57.1	26.2^{b}	18.1^{b}	121.0
	8	49.4	21.7^{a}	15.3^{a}	87.6	58.7	28.1^{a}	22.0^{a}	126.8
E2	Mean	49.3	20.1^{A}	13.0^{A}	83.2	57.2^{A}	26.3^{A}	18.6^{A}	119.7
	0	46.9	16.7^{b}	8.9^{b}	79.6	56.6	22.7^{b}	14.5^{b}	107.5
	2	49.8	20.5^{a}	14.1^{a}	83.0	57.1	27.4^{a}	20.0^{a}	121.4
	4	49.8	21.5^{a}	14.6^{a}	85.3	56.8	27.2^{a}	19.7^{a}	123.7
	8	50.6	21.5^{a}	14.7^{a}	84.7	58.3	27.8^{a}	20.1^{a}	126.1
Dose	0	46.9^{B}	16.7	8.9	79.7^{B}	56.6	22.7	14.5	107.5^{C}
	2	48.7^{A}	19.3	12.1	83.5^{A}	56.8	25.4	16.9	118.7^{B}
	4	48.9^{A}	19.8	12.8	84.5^{A}	57.0	25.7	17.6	121.5^{AB}
	8	49.7^{A}	20.4	13.7	85.0^{A}	57.4	26.2	18.6	124.3^{A}
SEM									
Enzyme		2.08	0.27	0.31	7.43	1.32	0.24	0.41	8.12
Dose		2.08	0.27	0.31	7.43	1.32	0.24	0.41	8.12
Interaction		2.23	0.55	0.61	7.59	1.38	0.49	0.82	8.52
P value									
Enzyme		0.15	<0.001	<0.001	0.14	0.04	<0.001	<0.001	0.36
Dose		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.09	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme*Dose		0.84	0.01	0.009	0.97	0.08	<0.001	<0.001	0.99

[a,b,c]Means within the same column within enzyme having different superscript letters are different at P<0.05

[A,B,C]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different superscript letters are different at P<0.05.

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

Table 4.2 Effect of enzyme (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (experiment 1.1, N=8) (Cont.)

Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP (ml/g DM)	Degradability (%)			Total GP (ml/g DM)
		DM	NDF	ADF		DM	NDF	ADF	
E3	Mean	48.1	18.3^{B}	11.2^{B}	81.8	56.8^{AB}	24.2^{B}	15.8^{B}	117.7
	0	46.9	16.7^{b}	8.9^{b}	79.6	56.6	22.7^{b}	14.5^{b}	107.5
	2	48.1	18.3^{a}	10.6^{b}	82.5	56.7	24.2^{a}	14.7^{b}	118.3
	4	47.9	19.1^{a}	12.8^{a}	82.2	57.0	24.9^{a}	17.0^{a}	122.0
	8	49.2	18.9^{a}	12.4^{a}	82.9	56.9	25.2^{a}	17.2^{a}	122.9
E4	Mean	47.9	18.4^{B}	10.5^{B}	83.1	56.5^{B}	23.9^{B}	15.2^{B}	116.0
	0	46.9	16.7^{b}	8.9^{b}	79.6	56.6	22.7^{b}	14.5	107.5
	2	48.1	18.9^{a}	10.5^{b}	83.6	56.5	24.6^{a}	15.3	115.7
	4	47.5	18.5^{a}	10.3^{b}	83.8	56.9	24.7^{a}	15.6	119.3
	8	48.9	19.5^{a}	12.4^{a}	84.4	55.8	23.8^{ab}	15.2	121.4
Dose	0	46.9^{B}	16.7	8.9	79.7^{B}	56.6	22.7	14.5	107.5^{C}
	2	48.7^{A}	19.3	12.1	83.5^{A}	56.8	25.4	16.9	118.7^{B}
	4	48.9^{A}	19.8	12.8	84.5^{A}	57.0	25.7	17.6	121.5^{AB}
	8	49.7^{A}	20.4	13.7	85.0^{A}	57.4	26.2	18.6	124.3^{A}
SEM									
Enzyme		2.08	0.27	0.31	7.43	1.32	0.24	0.41	8.12
Dose		2.08	0.27	0.31	7.43	1.32	0.24	0.41	8.12
Interaction		2.23	0.55	0.61	7.59	1.38	0.49	0.82	8.52
P value									
Enzyme		0.15	<0.001	<0.001	0.14	0.04	<0.001	<0.001	0.36
Dose		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.09	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme*Dose		0.84	0.01	0.009	0.97	0.08	<0.001	<0.001	0.99

^{a,b,c}Means within the same column within enzyme having different superscript letters are different at P<0.05

^{A,B,C}Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different superscript letters are different at P<0.05.

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3.3 การทดลองที่ 2

หลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไม่มีผล (P≥0.22) ต่อ DMD แต่ NDFD และ ADFD จะแตกต่างกัน (P<0.01) ระหว่างชนิดของเอนไซม์ (Table 4.4) หลังจากการบ่ม 24 ชม. NDFD ของเอนไซม์ E3 จะต่ำกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และ ADFD ของเอนไซม์ E3 และ E4 จะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ E1 และ E2 หลังจากการบ่ม 48 ชม. NDFD ของเอนไซม์ E3 และ E4 จะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ E2 โดยของเอนไซม์ E1 จะปานกลาง และ ADFD ของเอนไซม์ E3 และ E4 จะต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ E1 และ E2

หลังจากการบ่ม 24 ชม. ทุกระดับการเสริมเอนไซม์เพิ่ม (P<0.05) NDFD และ ADFD เป็นเส้นตรง โดยระดับการเสริมสูงสุด (4μl/g DM) แตกต่างจากระดับการเสริมปานกลาง (0.5–2.0μl/g DM) ซึ่งทุกระดับการเสริมแตกต่างจากระดับการเสริม control หลังจากการบ่มที่ 48 ชม. NDFD เพิ่มขึ้น (P<0.001) แบบ quadratic ตามระดับการเสริม แต่สำหรับ ADFD ผลของระดับการเสริมขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ (enzyme x dose interaction, P=0.005) สำหรับเอนไซม์ E1 และ E2 ผลตอบสนองของ ADFD เป็นแบบ linear และ quadratic ต่อระดับการเสริม ในขณะที่ เอนไซม์ E3 และ E4 เป็นแบบ linear ต่อ ระดับการเสริม

Total GP หลังจากการบ่ม 24 ชม. สูงสุดสำหรับเอนไซม์ E1 และ E2 และต่ำสุดสำหรับเอนไซม์ E4 (P<0.05) โดยทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม TGP ได้เท่ากัน (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ control หลังจากการบ่ม 48 ชม. TGP ของเอนไซม์ E1, E2 และ E3 จะสูงกว่า (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ E4 และทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม TGP (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับ control ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดแสดงรูปแบบของ GP rate (ml/h) เหมือนกัน โดยอัตราขึ้นสูงสุดหลังจากการบ่ม 18 ชม. (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ไม่มี enzyme x dose interactions (P>0.05) ของตัวแปรต่างๆ ที่เกิดจากกระบวนการหมักหลังจากการบ่ม 24 หรือ 48 ชม. (Table 4.5) หลังจากการบ่ม 24 ชม. total VFA ของเอนไซม์ E1 จะสูงกว่า (P<0.05) เอนไซม์ชนิดอื่นๆ และผลตอบสนองต่อระดับการเสริมเป็นแบบ linear และ cubic (P=0.008) หลังจากการบ่ม 48 ชม. total VFA ของเอนไซม์ E2 จะสูงกว่า (P<0.05) เอนไซม์ E1 ในขณะที่เอนไซม์อื่นๆ จะอยู่ที่ระดับปานกลาง (P>0.05) ทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม (P<0.001) total VFA ในลักษณะที่เป็น quadratic ที่ 48 ชม. หลังจากบ่ม 24 ชม. ไม่มีความแตกต่างระหว่างชนิดของเอนไซม์ (P>0.05) ต่อ molar proportions ของ VFA หรือสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate แต่หลังจากการบ่มที่ 48 ชม. propionate proportion ของเอนไซม์ E4 จะต่ำกว่า (P<0.05) เอนไซม์ E1 และ E3 และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate ของเอนไซม์ E4 และ E2 จะสูงกว่า เอนไซม์ E3 อย่างไรก็ตาม ระดับการเสริมไม่มีผลต่อ molar proportions ของ acetate หรือ propionate หรือสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate หลังจากการบ่ม 48 ชม.

Table 4.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 1) (N = 8)

		24					48				
Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E1	Mean	123.5	63.9^{A}	15.9^{C}	12.3^{AB}	4.02^{A}	128.5^{AB}	60.1	17.8	13.5	3.37
	0	122.8	63.9^{ab}	15.9	12.4	4.01^{ab}	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	128.6	64.1^{a}	15.7	12.3	4.10^{ab}	131.0	59.9	17.9	13.6	3.35
	4	119.7	63.4^{b}	16.1	12.6	3.92^{b}	126.9	60.1	17.8	13.5	3.37
	8	122.9	64.1^{a}	15.8	12.2	4.05^{a}	124.9	59.9	18.0	13.5	3.34
E2	Mean	118.8	63.9^{A}	16.1^{AB}	12.2^{BC}	3.96^{B}	125.4^{B}	59.9	18.0	13.6	3.34
	0	122.8	63.9	15.9	12.4	4.01	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	118.5	64.0	16.1	12.2	3.93	126.5	59.8	18.1	13.5	3.31
	4	116.4	63.9	16.1	12.2	3.96	120.4	59.9	18.1	13.5	3.31
	8	117.3	63.7	16.3	12.2	3.95	123.2	59.5	18.1	13.7	3.29
Dose	0	122.3	63.8^{A}	15.9^{B}	12.4^{A}	4.01^{A}	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	117.6	64.0^{A}	15.9^{B}	12.2^{B}	3.99^{B}	129.8	60.0	17.9	13.5	3.35
	4	113.7	63.5^{A}	16.2^{A}	12.4^{A}	3.93^{AB}	129.4	60.0	17.9	13.5	3.36
	8	119.4	63.6^{B}	16.2^{A}	12.3^{AB}	3.93^{C}	128.7	60.1	17.9	13.7	3.37
SEM											
Enzyme		2.87	0.10	0.06	0.05	0.018	2.03	0.19	0.09	0.08	0.026
Dose		2.87	0.10	0.06	0.05	0.018	2.03	0.19	0.09	0.08	0.026
Interaction		5.75	0.20	0.11	0.09	0.036	4.05	0.38	0.19	0.15	0.052
P											
Enzyme		0.14	0.001	0.001	0.007	<0.001	0.03	0.34	0.07	0.62	0.08
Dose		0.20	0.002	<0.001	0.02	0.003	0.83	0.30	0.08	0.85	0.11
Enzyme*Dose		0.93	0.04	0.14	0.11	0.008	0.40	0.80	0.91	0.73	0.85

[a,b,c]Means within the same columns within enzyme having different letters are different at P<0.05.

[A,B,C]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1;

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

Table 4.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 1, N = 8) (Cont.)

		24					48				
Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E3	Mean	114.2	63.9^{A}	16.0^{BC}	12.1^{C}	3.99^{AB}	131.7^{A}	60.1	17.8	13.5	3.38
	0	122.8	63.9	15.9	12.4	4.01^{ab}	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	110.4	64.2	15.9	12.1	4.03^{a}	125.6	60.2	18.0	13.2	3.36
	4	108.4	63.9	16.0	12.2	3.99^{ab}	136.8	59.9	17.9	13.6	3.35
	8	117.2	63.7	16.2	12.2	3.92^{b}	133.3	60.2	17.9	13.4	3.36
E4	Mean	116.6	63.4^{B}	16.2^{A}	12.4^{A}	3.88^{C}	133.6^{A}	60.4	17.6	13.4	3.43
	0	122.8	63.9^{a}	15.9	12.4	4.01^{a}	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	113.1	63.9^{a}	16.1	12.2	3.89^{a}	136.0	60.1	17.8	13.5	3.38
	4	110.1	62.8^{b}	16.4	12.6	3.83^{ab}	133.7	60.1	17.6	13.5	3.42
	8	120.1	62.9^{b}	16.5	12.5	3.79^{b}	133.3	60.9	17.5	13.2	3.50
Dose	0	122.3	63.8^{A}	15.9^{B}	12.4^{A}	4.01^{A}	131.3	60.5	17.6	13.5	3.44
	2	117.6	64.0^{A}	15.9^{B}	12.2^{B}	3.99^{B}	129.8	60.0	17.9	13.5	3.35
	4	113.7	63.5^{A}	16.2^{A}	12.4^{A}	3.93^{AB}	129.4	60.0	17.9	13.5	3.36
	8	119.4	63.6^{B}	16.2^{A}	12.3^{AB}	3.93^{C}	128.7	60.1	17.9	13.7	3.37
SEM											
Enzyme		2.87	0.10	0.06	0.05	0.018	2.03	0.19	0.09	0.08	0.026
Dose		2.87	0.10	0.06	0.05	0.018	2.03	0.19	0.09	0.08	0.026
Interaction		5.75	0.20	0.11	0.09	0.036	4.05	0.38	0.19	0.15	0.052
P											
Enzyme		0.14	0.001	0.001	0.007	<0.001	0.03	0.34	0.07	0.62	0.08
Dose		0.20	0.002	<0.001	0.02	0.003	0.83	0.30	0.08	0.85	0.11
Enzyme*Dose		0.93	0.04	0.14	0.11	0.008	0.40	0.80	0.91	0.73	0.85

[a,b,c]Means within the same columns within enzyme having different letters are different at P<0.05.

[A,B,C]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 3.1.

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

Table 4.4 Effect of enzyme additives (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2) (N = 8)

Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP	Degradability (%)			Total GP
		DM	NDF	ADF	ml/ g DM	DM	NDF	ADF	ml/ g DM
E1	Mean	44.1	17.9	9.2^{A}	72.8^{AB}	56.0	24.5^{AB}	14.9^{A}	100.8^{A}
	0	42.5	16.2	7.0	67.7	55.1	22.9	12.5^{c}	96.2
	0.5	44.5	17.6	9.0	70.7	55.9	23.9	12.9^{c}	101.1
	1.0	45.0	17.6	9.0	74.8	56.5	24.7	15.2^{b}	103.4
	2.0	44.2	18.3	9.5	74.4	55.9	25.0	15.8^{b}	100.7
	4.0	44.2	19.7	11.5	76.5	56.4	26.1	18.0^{a}	102.4
E2	Mean	43.5	17.8	8.9^{A}	74.3^{A}	56.1	24.9^{A}	15.1^{A}	100.0^{A}
	0	42.5	16.2	7.0	67.7	55.1	22.9	12.5^{c}	96.2
	0.5	43.1	17.8	8.3	76.0	56.5	24.7	14.8^{b}	101.6
	1.0	42.6	17.7	8.8	77.3	56.2	24.9	15.2^{ab}	100.3
	2.0	44.8	18.3	9.9	74.9	56.3	26.0	16.6^{a}	99.2
	4.0	44.4	19.0	10.6	76.3	56.5	25.8	16.3^{ab}	102.8
Dose	0	42.5	16.2^{C}	7.0^{C}	67.7^{B}	55.1	22.9^{D}	12.5	96.2
	0.5	43.8	17.4^{B}	8.1^{B}	73.0^{A}	55.8	23.8^{C}	13.3	99.5
	1.0	43.2	17.5^{B}	8.2^{B}	74.0^{A}	56.0	24.2^{BC}	14.2	100.6
	2.0	44.0	17.7^{AB}	8.8^{B}	73.4^{A}	56.0	24.8^{B}	15.0	99.5
	4.0	44.3	18.7^{A}	10.0^{A}	74.3^{A}	56.3	25.6^{A}	15.8	100.4
SEM									
Enzyme		0.85	0.35	0.35	0.70	0.29	0.26	0.25	1.16
Dose		0.95	0.40	0.39	0.78	0.33	0.29	0.28	1.30
Enzyme*Dose		1.90	0.79	0.77	1.57	0.66	0.57	0.56	2.60
P-values									
Enzyme		0.83	0.16	0.004	<0.001	0.55	0.005	<0.001	0.02
Dose		0.64	<0.001	<0.001	<0.001	0.14	<0.001	<0.001	0.13
Enzyme*Dose		1.00	0.99	0.88	0.47	1.00	0.83	0.008	0.77

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

[a,b,c]Means within the same columns within enzyme having different letters are different at P<0.05.

[A,B,C,D]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

Table 4.4 Effect of enzyme additives (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2, N = 8) (Cont.)

Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP	Degradability (%)			Total GP
		DM	NDF	ADF	ml/ g DM	DM	NDF	ADF	ml/ g DM
E3	Mean	43.8	16.9	7.8^{B}	72.3^{BC}	55.7	24.0^{BC}	13.5^{B}	100.0^{A}
	0	42.5	16.2	7.0	67.7	55.1	22.9	12.5^{c}	96.2
	0.5	44.0	16.9	7.9	74.5	55.6	23.9	13.1^{c}	102.3
	1.0	42.9	17.3	7.6	73.1	55.7	23.6	13.3^{c}	102.2
	2.0	44.5	16.4	7.4	73.3	56.0	24.3	13.9^{bc}	101.5
	4.0	45.0	17.5	9.1	73.0	56.2	25.3	15.0^{b}	97.7
E4	Mean	43.0	17.5	7.8^{B}	70.4^{C}	55.6	23.6^{C}	13.1^{B}	96.1^{B}
	0	42.5	16.2	7.0	67.7	55.1	22.9	12.5^{ab}	96.2
	0.5	43.8	17.3	7.2	70.6	55.2	22.7	12.3^{b}	93.0
	1.0	42.2	17.1	7.4	71.0	55.7	23.7	13.1^{ab}	96.2
	2.0	42.7	18.0	8.3	71.1	56.0	24.0	13.8^{a}	96.4
	4.0	43.7	18.74	9.0	71.5	56.0	25.2	13.9^{a}	98.7
Dose	0	42.5	16.2^{C}	7.0^{C}	67.7^{B}	55.1	22.9^{D}	12.5	96.2
	0.5	43.8	17.4^{B}	8.1^{B}	73.0^{A}	55.8	23.8^{C}	13.3	99.5
	1.0	43.2	17.5^{B}	8.2^{B}	74.0^{A}	56.0	24.2^{BC}	14.2	100.6
	2.0	44.0	17.7^{AB}	8.8^{B}	73.4^{A}	56.0	24.8^{B}	15.0	99.5
	4.0	44.3	18.7^{A}	10.0^{A}	74.3^{A}	56.3	25.6^{A}	15.8	100.4
SEM									
Enzyme		0.85	0.35	0.35	0.70	0.29	0.26	0.25	1.16
Dose		0.95	0.40	0.39	0.78	0.33	0.29	0.28	1.30
Enzyme*Dose		1.90	0.79	0.77	1.57	0.66	0.57	0.56	2.60
P-values									
Enzyme		0.83	0.16	0.004	<0.001	0.55	0.005	<0.001	0.02
Dose		0.64	<0.001	<0.001	<0.001	0.14	<0.001	<0.001	0.13
Enzyme*Dose		1.00	0.99	0.88	0.47	1.00	0.83	0.008	0.77

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

[a,b,c]Means within the same columns within enzyme having different letters are different at P<0.05.

[A,B,C,D]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

Table 4.5 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2) (N = 8)

	Dose (µl/g DM)	24 h					48 h				
		Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E1	Mean	118.3^{A}	61.1	17.5	13.0	3.49	126.2^{B}	56.3	20.2^{AB}	14.4	2.79^{BC}
	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	116.9	61.0	17.5	13.1	3.49	126.8	56.2	20.4	14.5	2.76
	1.0	120.9	61.2	17.7	13.0	3.47	127.7	56.1	20.4	14.5	2.75
	2.0	119.9	61.4	17.6	12.7	3.49	124.3	56.6	20.2	14.3	2.80
	4.0	118.7	61.4	17.5	12.8	3.52	130.0	56.6	20.2	14.2	2.81
E2	Mean	110.9^{B}	60.9	17.6	13.0	3.47	132.7^{A}	56.7	20.0^{BC}	14.3	2.85^{AB}
	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	105.8	61.1	17.5	12.9	3.50	130.2	56.8	20.1	14.1	2.84
	1.0	110.6	61.4	17.5	12.8	3.51	135.5	57.1	19.7	14.2	2.90
	2.0	111.4	60.8	17.8	13.1	3.42	140.8	57.3	20.0	13.9	2.88
	4.0	108.8	60.8	17.9	13.0	3.41	135.4	56.3	20.1	14.5	2.81
Dose	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2^{B}	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	112.8	61.2	17.6	12.9	3.49	130.1^{A}	56.6	20.1	14.4	2.82
	1.0	111.3	61.3	17.6	12.8	3.49	130.4^{A}	56.3	20.0	14.5	2.81
	2.0	113.5	60.9	17.7	12.9	3.45	134.0^{A}	56.8	20.0	14.2	2.85
	4.0	111.0	61.1	17.7	12.8	3.45	129.6^{A}	56.0	20.2	14.6	2.79
SEM											
Enzyme		2.10	0.33	0.09	0.22	0.035	1.77	0.29	0.10	0.17	0.027
Dose		2.35	0.37	0.10	0.24	0.039	1.98	0.33	0.12	0.20	0.030
Interaction		4.70	0.74	0.21	0.48	0.078	3.95	0.65	0.23	0.39	0.061
P-values											
Enzyme		0.03	0.98	0.93	0.98	0.96	0.05	0.24	<0.001	0.58	0.02
Dose		0.24	0.54	0.09	0.34	0.85	0.001	0.51	0.85	0.37	0.68
Enzyme*Dose		0.79	0.99	0.82	0.99	0.97	0.48	0.74	0.24	0.99	0.44

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 3.1.

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate; Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[A,B,C]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

Table 4.5 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on the volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid (Experiment 2 N = 8) (Cont.)

	Dose (µl/g DM)	24 h					48 h				
		Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E3	Mean	112.0^{B}	60.9	17.6	13.0	3.47	130.4^{AB}	55.9	20.3^{A}	14.6	2.76^{C}
	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	111.8	60.8	17.8	13.1	3.42	136.5	57.0	20.0	14.2	2.86
	1.0	106.6	60.9	17.6	13.0	3.47	133.3	55.3	20.4	14.8	2.71
	2.0	115.5	61.1	17.6	12.9	3.47	138.0	56.2	20.2	14.4	2.78
	4.0	108.4	61.3	17.6	12.9	3.50	125.0	54.8	20.8	14.9	2.63
E4	Mean	111.3^{B}	60.9	17.6	12.9	3.49	127.8^{AB}	56.4	19.7^{C}	14.6	2.87^{A}
	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	116.7	61.6	17.4	12.6	3.55	127.1	55.9	19.8	14.7	2.82
	1.0	107.2	61.6	17.5	12.6	3.53	128.7	56.6	19.7	14.4	2.87
	2.0	106.9	60.4	17.8	13.1	3.40	132.9	57.1	19.4	14.2	2.94
	4.0	107.9	60.7	18.0	12.9	3.38	128.1	56.4	19.5	14.7	2.90
Dose	0	117.9	60.4	17.4	13.4	3.49	122.2^{B}	56.1	20.0	14.7	2.81
	0.5	112.8	61.2	17.6	12.9	3.49	130.1^{A}	56.6	20.1	14.4	2.82
	1.0	111.3	61.3	17.6	12.8	3.49	130.4^{A}	56.3	20.0	14.5	2.81
	2.0	113.5	60.9	17.7	12.9	3.45	134.0^{A}	56.8	20.0	14.2	2.85
	4.0	111.0	61.1	17.7	12.8	3.45	129.6^{A}	56.0	20.2	14.6	2.79
SEM											
Enzyme		2.10	0.33	0.09	0.22	0.035	1.77	0.29	0.10	0.17	0.027
Dose		2.35	0.37	0.10	0.24	0.039	1.98	0.33	0.12	0.20	0.030
Interaction		4.70	0.74	0.21	0.48	0.078	3.95	0.65	0.23	0.39	0.061
P-values											
Enzyme		0.03	0.98	0.93	0.98	0.96	0.05	0.24	<0.001	0.58	0.02
Dose		0.24	0.54	0.09	0.34	0.85	0.001	0.51	0.85	0.37	0.68
Enzyme*Dose		0.79	0.99	0.82	0.99	0.97	0.48	0.74	0.24	0.99	0.44

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 3.1.

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate; Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[A,B,C]Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P<0.05.

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งแต่ละชนิดจะมีเอกลักษณ์เฉพาะของ endoglucanase, exoglucanase และ xylanase activities ถึงแม้ minor fibrolytic enzymic activities อื่นๆ จะไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะผันแปรระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์เหล่านี้ โดยปกติแล้ว สารเสริมเอนไซม์ จะมี fibrolytic activities ครอบคลุมอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ สารอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ และสภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ดังที่ได้มีการทบทวนเอกสารโดย Beauchemin et al. (2004) ยังไม่มีการสอบเทียบมาตรฐานถึงวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ enzyme activity ของ ruminant feed enzymes ดังที่ Colombatto and Beauchemin (2003) ชี้ให้เห็นว่าผลของ enzymic activity ที่ได้จากการวิเคราะห์นั้น ขึ้นอยู่กับสภาวะของการวิเคราะห์เอนไซม์ โดยเฉพาะ substrate ที่ใช้ อุณหภูมิ และระดับ pH ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ oat spelt และ birch wood xylan ในการวิเคราะห์หา xylanase มีสหสัมพันธ์อย่างมากระหว่างผลวิเคราะห์ xylanase activities กับ substrate ทั้ง 2 ชนิด และสามารถจัดอันดับของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกันกับการใช้ xylan substrate อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1, E2 และ E3 จะมี xylanase activity สูงกว่า เมื่อใช้ oat spelt เป็น substrate ในขณะที่ผลิตภัณฑ์เอนไซมี E4 จะมี xylanase activity สูงกว่า เมื่อใช้ birch wood เป็น substrate ทั้ง birch wood และ oat spelt มีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความแตกต่างของ xylanase activity เมื่อใช้เป็น xylan substrate โครงสร้างของ xylan จากแหล่งที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับขั้นตอนการสกัด (Ghatora et al., 2006) xylan จากหญ้าและธัญพืช (เช่น oat spelt) มีองค์ประกอบของ arabinofuranosyl และ glucopyranosyl uronic acid ในขณะที่ xylan จาก hardwoods (เช่น birch wood) มีองค์ประกอบของ glucopyranosyl uronic acid อยู่มาก และมีองค์ประกอบของ arabinofuranosyl อยู่น้อยมาก (Kormelink and Voragen, 1993) ดังนั้น oat spelt xylan ปกติจะจัดว่าเป็นตัวแทนของ substrate ที่ใช้ในการศึกษาเอนไซม์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง Kung et al. (2002) รายงานรูปแบบที่แตกต่างกันของ enzyme activity เมื่อทำการวิเคราะห์หา activity ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ระดับ pH ที่แตกต่างกัน และแนะนำว่าถ้าเสริมเอนไซม์ขณะให้อาหาร สารเสริมเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องมี activity สูง ที่ระดับ pH ในช่วงเดียวกันกับระดับ pH ในกระเพาะหมัก สำหรับอุณหภูมิใช้เหตุผลทำนองเดียวกันกับระดับ pH ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการวิเคราะห์ enzyme activity ที่ระดับ pH 6.0 และอุณหภูมิ 39ºC ตามคำแนะนำของ Colombatto and Beauchemin (2003) เพื่อสะท้อนถึงค่าเฉลี่ยของสภาวะภายในกระเพาะหมักของโคนมที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยอาหารหยาบและอาหารข้น การศึกษาครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบศักยภาพของ fibrolytic enzyme additives ที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า ที่ใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบหลัก วิธีการวิเคราะห์ทางชีวเคมีส่วนใหญ่ใช้ in vitro techniques เพื่อทำนาย in vivo response ต่อ exogenous enzymes ทั้งนี้เพราะผลตอบสนองของตัวสัตว์ไม่สามารถคาดการณ์

ได้จาก enzyme activities ตามลำพัง (Beauchemin et al., 2004) นอกจากนี้แล้ว การทำการศึกษาวิจัยการให้อาหารสัตว์มีต้นทุนสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อคัดกรองหาศักยภาพของเอนไซม์เพื่อไปการทำการทดลองต่อไป ในขณะที่การวิเคราะห์หา enzyme activity แบบ in vitro assay สามารถใช้เป็นประโยชน์ในการจำแนกประสิทธิภาพของ enzyme additives ในการศึกษาการให้อาหาร ปัจจัยต่างๆ อาทิ การเพิ่มระดับการเสริม จากผลการทดลองใน in vitro เพื่อทดลองใน in vivo วิธีการเสริมเอนไซม์ในอาหาร ความแตกต่างขององค์ประกอบอาหาร และความผันแปรของตัวสัตว์ เหล่านี้สามารถมีผล ไม่ว่าจะเป็นการวิเคราะห์แบบ in vitro หรือ in vivo (Beauchemin et al., 2004) เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์แบบ in vitro เพื่อนำผลไปแนะนำการใช้ในการให้อาหารโคนมในอนาคต สารละลาย buffer ที่ใช้ จึงปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6.0 เพื่อสะท้อนถึงระดับ pH ปกติในกระเพาะหมักของโคนม ระดับ pH หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชม. อยู่ในช่วง 5.69 – 6.00 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ระดับ pH ที่ค่อนข้างต่ำในการวิเคราะห์โดยใช้ batch culture ในการศึกษาครั้งนี้ มีผลทำให้ค่า NDFD และ ADFD ที่ 48 ชม. ต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี in vitro assay ที่ใช้สารละลาย buffer ที่มีระดับ pH สูงกว่า เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการคัดกรอง in vitro ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการศึกษา in vivo จึงใช้สารเสริมเอนไซม์ 2 ชนิด (E1 และ E4) ซึ่งเคยใช้ในการทดลองกับโคนม ที่ให้ผลในทางบวก อย่างไรก็ตาม มีเพียงการศึกษาของ Arriola et al. (2011) ที่ใช้ต้นข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบ โดยศึกษาในโครีดนมระยะต้นของการให้นมจำนวน 60 ตัว ให้ได้รับอาหารข้นระดับสูง (520 g/kg roughage, including 370 g/kg corn silage) และระดับต่ำ (670 g/kg roughage, including 490 g/kg corn silage) โดยเสริมและไม่เสริมเอนไซม์ (E1; DM basis; 3.4 mg of enzyme/g of ration DM) ประสิทธิภาพการผลิตน้ำนม (kg of 3.5% fat-corrected milk/kg of DM intake) เพิ่มขึ้น 16% ในกลุ่มที่ได้รับอาหารข้นต่ำ และ 6% ในกลุ่มที่ได้รับอาหารข้นสูง ในการทดลองเมแทบอลิซึมพร้อมๆ กันโดยใช้กลุ่มการทดลองเหมือนกัน DM, CP, NDF และ ADF total tract digestibility เพิ่มขึ้นทั้งหมดด้วยการเสริมเอนไซม์ ไม่ว่าระดับอาหารหยาบในอาหารจะเป็นเท่าไร ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ E1 เป็น positive control ในการศึกษาครั้งนี้

ถึงแม้ว่าจะมีความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างผลการทดลองในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 ผลของการทดลองที่ 2 ยืนยันผลการทดลองที่พบในการทดลองที่ 1 จากที่มีการเพิ่ม NDFD และ ADFD ในทั้ง 2 การทดลอง ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 และ E4 หลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. (Fig. 1) เอนไซม์ E1 สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 30% และ 24% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในการทดลองที่ 1 และเพิ่มได้ถึง 22% และ 14% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 ทำนองเดียวกัน เอนไซม์ E2 สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 29% และ 22% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในการทดลองที่ 1 และสามารถเพิ่มได้ถึง 17% และ 14% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 เอนไซม์ทุกชนิดสามารถเพิ่ม ADFD ได้มากกว่า NDFD เอนไซม์ E1 สามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 72% และ 52% ที่ระยะเวลาบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในการทดลอง

ที่ 1 และสามารถเพิ่มได้ถึง 65% และ 44% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 เอนไซม์ E2 สามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 65% และ 39% ที่ระยะเวลาบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในการทดลองที่ 1 และสามารถเพิ่มได้ถึง 51% และ 33% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 ดังนั้น ความสามารถในการเพิ่ม NDFD และ ADFD ของเอนไซม์ E1 และ E2 นั้นเหมือนกัน จากการที่เอนไซม์ E1 สามารถเพิ่มผลผลิตของโคนมที่ได้รับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นส่วนประกอบ (Arriola et al., 2011) จึงแนะนำว่า ควรทำการศึกษาการเสริมเอนไซม์ E2 ในโคนมที่ได้รับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นส่วนประกอบต่อไป เอนไซม์ E3 สามารถเพิ่ม NDFD ได้สูงสุดที่ 13% และ 11% ภายหลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในการทดลองที่ 1 และสามารถเพิ่มได้ถึง 8% และ 10% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 (Fig. 1) ส่วน ADFD นั้นเพิ่มขึ้นถึง 39% และ 19% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 1 และเพิ่มขึ้นถึง 30% และ 20% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 ในขณะที่เอนไซม์ E3 ให้ผลไปในทางบวก แต่การเพิ่มการย่อยได้ NDF และ ADF นั้นจะต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ E1 และ E2 ดังนั้นถ้าจะใช้เอนไซม์ E3 เป็นสารเสริมในอาหารโคนม ราคาของเอนไซม์ E3 ต้องต่ำกว่าราคาของเอนไซม์ E1 และ E2 ค่อนข้างมาก ทั้งนี้เพราะต้องใช้ระดับการเสริมที่สูงกว่า ส่วนเอนไซม์ E4 สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ได้สูงสุดเท่าๆ กับที่พบในเอนไซม์ E3 (Fig. 1) ในการทดลองที่ 1 เอนไซม์ E4 สามารถเพิ่ม NDFD ได้สูงสุด 17% หลังจากการบ่มที่ 24 ชม. และ 5% หลังจากการบ่ม 48 ชม. และในการทดลองที่ 2 สามารถเพิ่มได้สูงสุด 15% และ 10% ตามลำดับ ส่วน ADFD มีค่า 39% หลังการบ่ม 24 ชม. และ 5% หลังการบ่ม 48 ชม. ในการทดลองที่ 1 และ 29% และ 11% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 สารเสริมเอนไซม์ E4 นี้ เคยใช้ในศึกษาโดย Holtshausen et al. (2011) โดยใช้โคนมในช่วงต้นระยะให้นมจำนวน 60 ตัว ได้รับอาหารที่ไม่ได้เสริมเอนไซม์ ได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ E4 ระดับต่ำ (E4; 0.5 ml of enzyme/kg of diet DM) และได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์ E4 ในระดับสูง (E4; 1.0 ml of enzyme/kg of diet DM) อาหารประกอบด้วย 520 g/kg roughage ที่มี 206 g/kg barley silage, 206 g/kg alfalfa silage และ 108 g/kg alfalfa hay (DM basis) ผลการทดลองพบว่า การเสริมเอนไซม์ในอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการให้น้ำนมเป็นเส้นตรง (kg of 3.5% fat-corrected milk/kg of DM intake) โดยเพิ่มขึ้น 11% เป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อใช้เอนไซม์ E4 ในการทดลอง in vitro batch culture ที่ 24 ชม. และใช้อาหารหยาบแต่ละชนิดแยกกัน การเพิ่มขึ้นของ NDFD และ ADFD สามารถพบได้เฉพาะใน alfalfa hay และเฉพาะในระดับการเสริมที่สูงเท่านั้น (2 ml of enzyme/kg of forage DM) ถ้าเปรียบเทียบการเสริมเอนไซม์ในการศึกษาครั้งนี้ที่สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD เมื่อใช้ต้นข้าวโพดหมัก กับการเพิ่ม NDFD และ ADFD เพียงเล็กน้อย ในการศึกษา in vitro ของ Holtshausen et al. (2011) ในอาหารหยาบอื่นๆ เป็นไปได้ว่า การเสริมเอนไซม์ E4 อาจให้ผลในทางบวก ถ้าใช้ในการศึกษา in vivo กับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นส่วนประกอบ

วัตถุประสงค์หนึ่งของการศึกษาครั้งนี้ คือการศึกษาถึงผลตอบสนองของระดับการเสริมเอนไซม์เพื่อหาระดับการเสริมที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด ถ้าให้ผลตอบสนองของตัวแปรต่างๆ ที่ศึกษา

ต่อระดับการเสริมเอนไซม์ และระยะเวลาการบ่ม แตกต่างกัน ระดับการเสริมที่เหมาะสมค่อนข้างจะขึ้นอยู่กับความคิดของแต่ละคน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงพิจารณากำหนดระดับที่เหมาะสม หมายถึงระดับการเสริมที่ทำให้ NDFD และ ADFD เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ control โดยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อระดับการเสริมสูงขึ้น สำหรับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 ระดับ NDFD และ ADFD สูงสุด เมื่อเสริมเอนไซม์ที่ระดับสูงสุดทั้ง 2 ระยะเวลาบ่ม ในทั้ง 2 การทดลอง ดังนั้น ระดับการเสริมที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 คือ 8μl/g DM ส่วนผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E2 ระดับการเสริมที่เหมาะสม คือ 2μl/g DM เพราะสามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ในการทดลองที่.1 โดยมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยที่ระดับการเสริมสูงขึ้น และมีผลตอบสนองเป็นเส้นตรงต่อระดับการเสริมที่ต่ำในการทดลองที่ 2 ส่วนผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 มีระดับการเสริมที่เหมาะสม คือ 4μl/g DM ทั้งนี้เพราะการเพิ่มระดับการเสริมที่สูงกว่านี้ไม่สามารถเพิ่ม ADFD ได้อีก สำหรับผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 มีระดับการเสริมที่เหมาะสม คือ 2μl/g DM ดังนั้น ผลของระดับการเสริมเอนไซม์ในการเพิ่มการย่อยได้เยื่อใยนั้นแตกต่างกันระหว่างผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์แต่ละชนิด จะมีความเฉพาะของ enzymic activities มีความแตกต่างของผลตอบสนองระหว่างชนิดของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ และระดับการเสริม ทำนองเดียวกัน Eun et al. (2007) รายงานว่า in vitro disappearance ของ NDF และ ADF ของ alfalfa hay และ corn silage เพิ่มขึ้นเมื่อเสริม exogenous fibrolytic enzymes แต่ผลตอบสนองขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และระดับการเสริม โดยเอนไซม์บางชนิดมีประสิทธิภาพต่ออาหารหยาบทั้ง 2 ชนิด เมื่อเสริมที่ 1.4 mg/g of DM แต่ที่ระดับการเสริมอื่นๆ ให้ผลเพียงปานกลางต่ออาหารหยาบทั้งสองชนิด การเพิ่มขึ้นของ NDFD และ ADFD ของ corn silage โดยการเสริม enzyme additives คาดหวังว่าจะเพิ่มการย่อยได้ของเยื่อใยในกระเพาะหมัก และการกินได้อาหารของโคนม โดยลด physical fill ในกระเพาะหมัก

การย่อยได้ของ NDF โดยวิธี in vitro หรือ in situ เป็น indicator ที่ดีในการเปรียบเทียบศักยภาพของอาหารหยาบในการเพิ่ม DM intake (Oba and Allen, 1999) Jung et al. (2004) รายงานว่าการเพิ่ม in vitro NDF digestibility ขึ้น 1% unit ของ corn silage ทำให้ 3.5% fat-corrected milk yield เพิ่มขึ้น 0.14 kg/d และเพิ่ม DM intake ขึ้น 0.12 kg/d ในโคนมที่ได้รับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักเป็นส่วนประกอบอยู่สูง (440 g/kg DM) นอกจากนี้ Oba and Allen (1999) รายงานเช่นเดียวกันว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างการย่อยได้ NDF ของอาหารหยาบ (in vitro หรือ in situ) และผลผลิตน้ำนมและการกินได้อาหาร ขนาดของผลตอบสนองของ NDFD และ ADFD ต่อการเพิ่มระดับการเสริมมีความแตกต่างกันระหว่าง enzyme additives ในลักษณะที่ไม่สามารถอธิบายได้ด้วย activity ของ xylanase (oat spelt) หรือ endoglucanase (Figs. 2 and 3) หรือกล่าวในอีกนัยหนึ่ง คือ enzyme activity เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการทำนายการเพิ่มขึ้นของ NDFD หรือ ADFD ได้ เหตุผลประการหนึ่งที่สนับสนุนคำกล่าวนี้ คือ การวิเคราะห์หา enzyme activities ใช้

substrate ที่เป็นตัวแทนของผนังเซลล์พืชที่มีความซับซ้อน จึงไม่อาจเป็นตัวแทนที่แท้จริงได้ (Beauchemin et al., 2004)

จากข้อมูลพื้นฐานของ TGP และ DMD ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ 24 ชม. ในทั้ง 2 การทดลอง ไม่มีความแตกต่าง หรือมีน้อยมาก และที่ 48 ชม. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1, E2 และ E3 มีประสิทธิภาพมากกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 ดังนั้น การย่อยสลายของ NDF และ ADF มีประโยชน์มากกว่าในการจำแนกประสิทธิภาพของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับ DM และ TGP

Volatile fatty acids เป็น end-products ของการหมักย่อยโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง การพบว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น total VFA ด้วยการเสริมเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลง molar proportions ของ VFA ค่อนข้างจะผันแปรระหว่างระยะเวลาบ่มที่ 24 และ 48 ชม. และระหว่างการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้น total VFA ไม่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ DMD, NDFD หรือ ADFD นอกจากนี้ ในการทดลองที่ 1 ที่ระยะการบ่ม 24 ชม. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 มีสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate สูงที่สุด และผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E4 มีต่ำที่สุด แต่ความแตกต่างนี้จะยังคงมีอยู่จนถึงระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ไม่พบความแตกต่างของสัดส่วน acetate ต่อ propionate ที่ 24 ชม. ดังกล่าว ในการทดลองที่ 2 และที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ผลิตภัรฑ์เอนไซม์ E4 มีสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate สูงที่สุด และผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 มีสัดส่วน acetate ต่อ propionate ต่ำที่สุด ในการเปรียบเทียบ การศึกษาใน in vivo โดย Arriola et al. (2011) พบว่า total VFA เพิ่มขึ้นในขณะที่ acetate: propionate ratio ลดลง เมื่อเสริมเอนไซม์ (E1) Chung et al. (2012) รายงานไม่มีผลของการเสริมเอนไซม์ (E4) ในอาหารที่ไม่มีส่วนประกอบของต้นข้าวโพดหมักต่อความเข้มข้นของ total VFA หรือ molar proportions ของ VFA แต่ละชนิด ใน ruminal fluid จากข้อมูลของการศึกษาครั้งนี้สามารถแนะนำได้ว่า การเปรียบเทียบผลของเอนไซม์โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของ VFA ไม่ใช่วิถีทางที่เป็นประโยชน์ในการคัดกรองศักยภาพของ enzyme additives in vivo การศึกษา in vitro assay ในครั้งนี้มุ่งสนใจระยะเวลาบ่มทั้งที่ 24 และ 48 ชม. ทั้งนี้เพราะไม่ชัดเจนว่าระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลานี้จะให้ผลเหมือนกันหรือไม่ ระยะเวลาบ่มในการศึกษา in vitro เพื่อประเมินการย่อยสลายได้ของเยื่อใยส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 24 และ 48 ชม. เพื่อให้สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยของ retention time ของอาหารหยาบในกระเพาะหมัก ในการทบทวนเอกสาร Owens and Goetsch (1986) รายงานว่า passage rate ของอาหารหยาบในโคเนื้อและโคนมที่ได้รับอาหาร 4.25% ของน้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ย 4.5%/h (ค่าเฉลี่ย retention time ที่ 22 ชม.) และโคที่ได้รับอาหารที่มีอาหารข้นเป็นส่วนประกอบ 20 – 50% มีค่า passage rate ของอาหารหยาบที่ 3.7%/h (ค่าเฉลี่ย retention time ที่ 27 ชม.) National Research Council (2001) ใช้ระยะเวลาบ่ม in vitro ที่ 48 ชม. ในการทำนายการย่อยได้ NDF ในกระเพาะหมักของโคนมที่ได้รับอาหารระดับดำรงชีพ Eun and Beauchemin (2007) ใช้ระยะเวลาบ่มที่ 24 ชม. ในการศึกษาการหมักย่อยใน in vitro batch culture และพบว่า exogenous enzymes

สามารถเพิ่ม in vitro disappearance ของ alfalfa และ corn silage เมื่อพิจารณาการย่อยสลายเยื่อใยที่ระดับการเสริมเอนไซม์สูงๆ (การทดลองที่ 4.1) ที่ระยะเวลาบ่มที่ 24 และ 48 ชม. ให้ผลเหมือนกัน ดังนั้นการใช้ระยะเวลาบ่มที่จุดใดจุดหนึ่งเพียงจุดเดียวน่าจะเพียงพอ อย่างไรก็ตาม ที่ระดับการเสริมต่ำๆ (การทดลองที่ 4.2) ความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์เอนไซม์จะเด่นชัดที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. นอกจากนี้ สำหรับ ADFD ผลตอบสนองของระดับการเสริมเอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ดังนั้นระยะเวลาบ่มที่ 48 ชม. มีประโยชน์มากที่สุด ในแง่ของการจำแนกผลตอบสนองของระดับการเสริมและแยกแยะชนิดของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ โดยสรุป ในแง่ของการใช้ in vitro assay ในการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการศึกษาในตัวสัตว์ แนะนำให้ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อ NDFD และ ADFD ทั้งที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. เพื่อที่จะได้เข้าใจถึง enzyme-forage response อย่างครอบคลุม

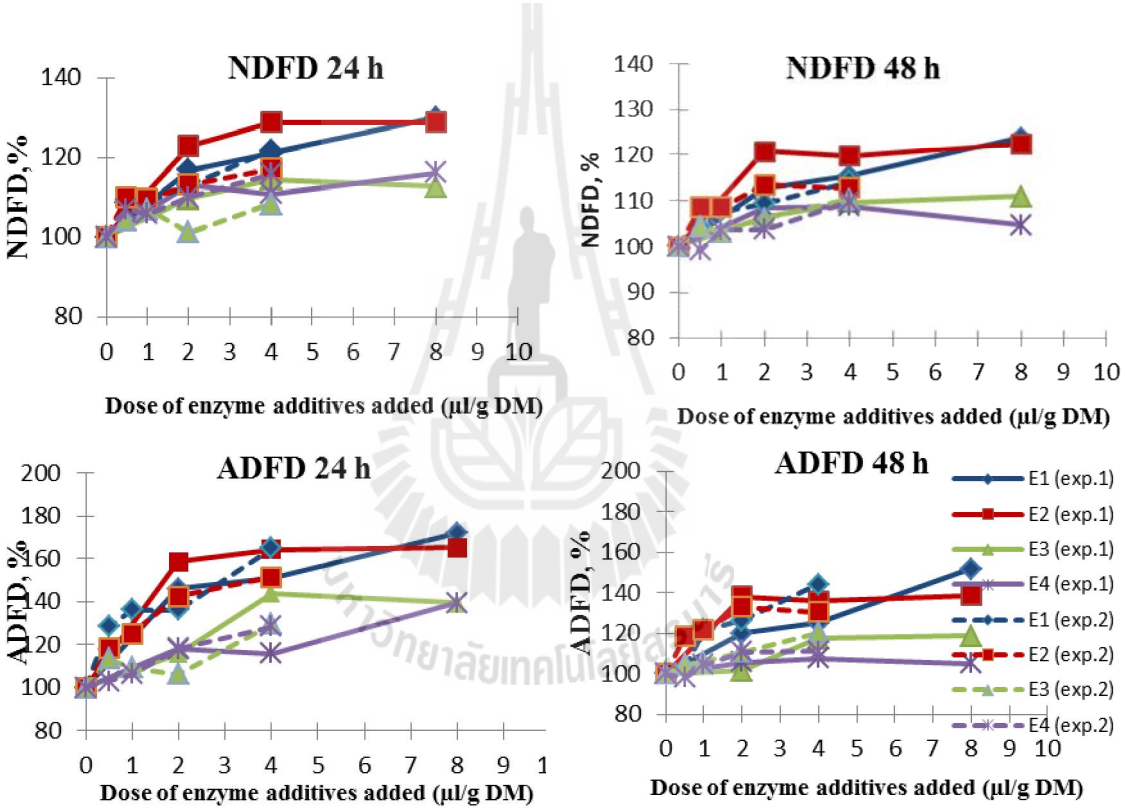


Figure 4.1. Percentage increase in neutral detergent fiber disappearance (NDFD) and acid detergent fiber disappearance (ADFD) from corn silage after 24 and 48 h of incubation in Experiment 1 and Experiment 2. Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

4.5 สรุป

ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีกิจกรรมของ endoglucanase, exoglucanase และ xylanase ที่แตกต่างกัน สารเสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของข้าวโพดหมัก in vitro โดยเอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่า E3 และ E4 ผลตอบสนองของตัวแปรต่อระดับการเสริมขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์ E1 ผลตอบสนองสูงสุดอยู่ที่ระดับการเสริมสูงสุด (8μl/g DM) ส่วนเอนไซม์ E2 การเสริมที่ระดับ 2μl/g DM เพิ่ม fiber disappearance แต่ไม่เพิ่มมากกว่านี้เมื่อระดับการเสริมเพิ่มขึ้น สำหรับเอนไซม์ E3 ระดับการเสริมที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่ระดับ 4μl/g DM ทั้งนี้เพราะที่ระดับการเสริมเอนไซม์สูงกว่านี้ไม่สามารถเพิ่ม ADFD ส่วนเอนไซม์ E4 ระดับการเสริมที่เหมาะที่สุดคือ 2μl/g DM โดยทั่วไปแล้ว NDF และ ADF มีประโยชน์มากกว่า DM และ TGP ในการจำแนกประสิทธิภาพของเอนไซม์ จากผลการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาการเสริมเอนไซม์เหล่านี้ต่อไปควรทำในโครีดนมที่ได้รับข้าวโพดหมักเป็นอาหารหยาบ

เอกสารอ้างอิง

Arriola, K.G., Kim, S.C., Staples, C.R., Adesogan, A.T., 2011. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 94, 832–841.

Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81E (Suppl. 2), E37–E47.

Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84, 23–36.

Chung, Y.-H., Zhou, M., Holtshausen, L., Alexander, T.W., McAllister, T.A., Guan, L.L., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations and enteric methane emissions. J. Dairy Sci. 95, 1419–1427.

Colombatto, D., Beauchemin, K.A., 2003. A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 83, 559–568.

Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., 2003. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. J. Anim. Sci. 81, 2617–2627.

Eun, J.-S., Beauchemin, K.A., 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes usingin vitro fermentation characteristics. Anim. Feed Sci. Technol. 132, 298–315.

Eun, J.-S., Beauchemin, K.A., Schulze, H., 2007. Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhancein vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90, 1440–1451.

Ghatora, S.K., Chadha, B.S., Badhan, A.K., Saini, H.S., Bhat, M.K., 2006. Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. BioResources 1, 18–33.

Giraldo, L.A., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2007. Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters. Br. J. Nutr. 98, 753–761.

Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

Holtshausen, L., Chung, Y.-H., Gerardo-Cuervo, H., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2011. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. J. Dairy Sci. 94, 899–907.

Jung, H.G., Allen, M.S., 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. J. Anim. Sci. 73, 2774–2790.

Jung, H.G., Raeth-Knight, M., Linn, J.G., 2004. Forage fiber digestibility: measurement, variability, and impact. In: Proceedings of the 65th Minnesota Nutrition Conference, pp. 105–125.

Knowlton, K.F., McKinney, J.M., Cobb, C., 2002. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. J. Dairy Sci. 85, 3328–3335.

Kormelink, F.J.M., Voragen, A.G.J., 1993. Degradation of different [(glucurono) arabino] xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes. Appl. Mirobiol Biotechnol. 38, 688–695.

Kung Jr., L., Cohen, M.A., Rode, L.M., Treacher, R.J., 2002. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85, 2396–2402.

Lewis, G.E., Sanchez, W.K., Hunt, C.W., Guy, M.A., Pritchard, G.T., Swanson, B.I., Treacher, R.J., 1999. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 611–617.

Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K., 1999. A semi-automatedin vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Technol. 79, 321–330.

National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh revised edition National Academy Press, Washington, DC, USA.

Oba, M., Allen, M.S., 1999. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 589–596.

Owens, F.M., Goetsch, A.L., 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan, L.P., Grovum, W.L., Dobson, A. (Eds.), Control of Digestion and Metabolism in Ruminants, Proceedings of the Sixth International Symposium on Ruminant Physiology, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, pp. 196–223.

Rode, L.M., Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., 1999. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 82,2121–2126.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal production. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Vicini, J.L., Bateman, H.G., Bhat, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L., Hard, D.L., 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. J. Dairy Sci. 86, 576–585.

Wang, Y., McAllister, T.A., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Nsereko, V.L., Iwaasa, A.D., Yang, W., 2001. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). Br. J. Nutr. 85, 325–332.

Wang, Y., McAllister, T.A., 2002. Rumen microbes, enzymes and feed digestion: a review. Asian–Australas. J. Anim. Sci. 15, 1659–1676.

Yang, H.J., Xie, C.Y., 2010. Assessment of fibrolytic activities of 18 commercial enzyme products and their abilities to degrade the cell wall fraction of corn stalks inin vitro enzymatic and ruminal batch cultures. Anim. Feed Sci. Technol. 159, 110–121.

Yang, W.Z., Beauchemin., K.A., Rode, L.M., 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. J. Dairy Sci. 83, 2512–2520.

บทที่ 5
ผลของ exogenous fibrolytic enzymes ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมัก in vitro ของต้นข้าวโพดหมัก 4 ชนิด
(Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of four corn silages)

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการประเมินผลของสารเสริมเอนไซม์ 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

Abstract

This 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.

5.1 บทนำ

การใช้สารเสริมเอนไซม์ย่อยเยื่อใยในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มการใช้ประโยชน์อาหารและผลผลิตสัตว์ งานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสำคัญต่อ cellulase และ xylanase เพื่อย่อยสลาย structural polysaccharides, cellulose และ hemicellulose ในพืช การเสริม fibrolytic enzyme additives สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใย และเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของอาหารหยาบ (Yang and Xie, 2010; Eun et al., 2007) เพิ่มการเข้าจับยึดของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก (Nsereko et al., 2002) การศึกษา *in vivo* แสดงผลตอบสนองในเชิงบวกเมื่อเสริม fibrolytic enzymes ให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Arriola et al., 2011; Holtshausen et al., 2011, Phakachoed et al., 2013) อย่างไรก็ตาม ผลตอบสนองในแง่ประสิทธิภาพของ fibrolytic enzyme additive ผันแปรขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ enzyme activity ชนิดและระดับการเสริมเอนไซม์ ชนิดของอาหาร วิธีการเสริมเอนไซม์ และสถานะทางสรีรวิทยาของสัตว์ (Beauchemin et al., 2003) เป็นไปไม่ได้ที่จะทำนายศักยภาพผลของเอนไซม์สำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยอาศัย enzymatic activities (Colombatto et al., 2003) งานวิจัยครั้งนี้ให้ความสนใจต่อต้นข้าวโพดหมักเพราะว่ามีการใช้ในโคในหลายภูมิภาคทั่วโลกและมีคุณค่าทางโภชนะค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม ต้นข้าวโพดหมักในภูมิภาคต่างๆ ของโลกมีคุณภาพแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ระยะการเจริญเติบโต พื้นที่เพาะปลูก การสะสมโภชนะในต้นข้าวโพด และส่วนของต้นข้าวโพด (อาทิ ต้น หรือใบ) นอกจากนี้ ยังไม่มีการศึกษาวิจัยว่าต้นข้าวโพดหมักที่มีคุณภาพแตกต่างกันจะมีผลต่อการตอบสนองของ fibrolytic enzyme additive หรือไม่ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินศักยภาพของ enzyme additive หลายชนิดที่มี enzyme activity แตกต่างกันเพื่อเพิ่ม *in vitro* ruminal fiber degradation และ fermentation profile ที่ใช้ต้นข้าวโพดหมัก 4 ชนิดเป็น substrate

5.2 อุปกรณ์และวิธีการ

แผนการทดลองเป็นแบบ completely randomized design ประกอบด้วย 2 runs (batches) และมี 4 ซ้ำต่อ run (replicates per run) ซึ่งแต่ละ run ดำเนินการคนละวัน

5.2.1 การเตรียม reagents

สารละลาย buffer

- Ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) 4 g
- Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 35 g
- ละลายในน้ำ เติมจนได้สารละลายปริมาตร 1 L ใน volumetric flask.

สารละลาย macromineral

- Sodium hydrogen phosphate, dibasic (Na_2HPO_4) 5.7 g
- Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4) 6.0 g
- Magnesium sulfate, heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.6 g
- ละลายในน้ำ เติมจนได้สารละลายปริมาตรr 1 L ใน volumetric flask.

หมายเหตุ: สารละลาย buffer และ macromineral สามารถเก็บไว้ได้นาน 3 เดือน ในตู้เย็น และ 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

สารละลาย micromineral

- Calcium chloride, dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$) 13.2 g
- Manganese chloride, tetrahydrate ($MnCl_2.4H_2O$) 10.0 g
- Cobalt chloride, hexahydrate ($CoCl_2.6H_2O$) 1.0 g
- Ferric chloride, hexahydrate ($FeCl_2.6H_2O$) 8.0 g
- ละลายในน้ำ เติมจนได้สารละลาย buffer 100 ml ใน volumetric flask.

หมายเหตุ: สารละลาย micromineral สามารถเก็บไว้ได้นาน 12 เดือน ในตู้เย็น

0.1% (wt/vol) Resazurin

- ละลาย 0.1 g of resazurin ในน้ำ 100 mL
- เก็บไว้ในที่มืด (ขวดสีอำพัน) ที่อุณหภูมิ 4°C (ตู้เย็น).

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (เตรียมในวันที่จะเริ่มต้นการทดลอง)

**สูตรนี้สำหรับ 1 L สามารถเพิ่มปริมาตรได้ตามต้องการ

- ชั่ง 2.5 g tryptone และละลายให้หมดในน้ำ 500 mL
- เติม 0.125 mL สารละลาย micromineral
- เติม 250 mL สารละลาย buffer และ 250 mL สารละลาย macromineral
- เติม 1.25 mL 0.1% resazurin solution
- วางภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อใน water bath (39°C) และปล่อยฟอง CO_2 ผ่านสารละลายเป็นเวลา 45 นาที
- ชั่ง 0.313 g L-cysteine hydrochloride และ 0.313 g sodium sulphide เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ปล่อยฟอง CO_2 ผ่านสารละลายอีกเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเทาเป็นใส

- ถ้าสารละลายเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีชมพู แสดงว่ายังมีออกซิเจนอยู่
- ถ้าสารละลายเปลี่ยนจากสีเทาเป็นสีใส แสดงว่าไม่มีออกซิเจนอยู่

- เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อใน water bath และ headspace saturated ด้วย CO_2 จนกระทั่งถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ + inoculums ไปยัง incubation vials (ที่จุดนี้ต้องเก็บ rumen fluid)

5.2.2 การเตรียม substrate และเอนไซม์

ต้นข้าวโพดหมักที่แตกต่างกันที่ใช้เป็น substrates แสดงไว้ในตารางที่ Table 5.1 นำ substrates ทั้ง 4 ชนิดไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชม. ใน hot air oven แล้วนำไปบดผ่านตะแกรง ขนาด 1 mm (Wiley mill standard model 4, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, USA) เก็บ substrates ไว้ในถุงพลาสติกเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และ *in vitro* fermentation ต่อไป ชั่งต้นข้าวโพดหมักบดน้ำหนักประมาณ 0.9 g DM บรรจุลงในถุงไนล่อนที่ผ่านการล้างด้วย acetone และชั่งน้ำหนักแล้ว (F57, Ankom Technology, Macedon, NY) ทำการเตรียมถุงไนล่อนจำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง และในแต่ละระยะเวลาบ่มใน batch culture เจือจางผลิตภัณฑ์เอนไซม์ด้วยน้ำ หลังจากนั้นเติมผลิตภัณฑ์เอนไซม์เจือจาง (200 µl) ลงบน substrate (corn silage) โดยตรง ที่บรรจุในถุงไนล่อนก่อนปิดปากถุง ที่ระดับการเสริมแต่ละเอนไซม์ 2 ระดับ: 0 (control) และ 4 µl/g of substrate DM ปิดปากถุงด้วยความร้อน (heat-sealed) แล้วบรรจุถุงไนล่อนลงในขวดขนาดปริมาตร 125 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม.

Table 5.1 Chemical composition of substrates incubated *in vitro*

	Dry matter (%)	Crude Protein (%)	Neutral detergent fibre (%)	Acid detergent Fibre (%)	Starch (%)
Corn silage 1	33.47	7.58	40.84	25.07	29.66
Corn silage 2	26.12	8.28	46.85	30.35	24.39
Corn silage 3	23.42	8.75	48.90	31.91	19.78
Corn silage 4	22.17	9.08	54.12	35.34	6.11

5.2.3 In vitro fermentations

เก็บตัวอย่าง rumen fluid จากโคเจาะกระเพาะ 3 ตัว หลังการให้อาหารมื้อเช้าประมาณ 3 ชม. กรองผ่าน cheese cloth 4 ชั้น ลงใน flask ที่ผ่าน oxygen-free CO_2 ตลอดเวลา ทำการชนย้าย rumen fluid ในinsulated flasks ไปยังห้องปฏิบัติการภายในเวลาไม่เกิน 1 ชม. หลังการเก็บตัวอย่าง เติม anaerobic buffer medium (60 ml; Goering and Van Soest, 1970) ที่ประกอบด้วย tryptone, สารละลาย buffer, สารละลาย macro และ micro mineral, resazurin และน้ำ ปรับ pH ที่ 6.0 ด้วย 1 M trans-aconitic acid (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) ลงในขวดที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ นอกจากสารละลาย buffer เติม rumen fluid (15 ml) ลงในแต่ละขวดในอัตราส่วน 1:4 (rumen fluid: anaerobic buffer medium) ภายใต้การผ่าน CO_2. อย่างต่อเนื่อง ปิดขวดด้วย rubber stoppers และ aluminium seal caps ทันทีหลังจากเติมสารละลาย บ่มขวดที่อุณหภูมิ 39°C บน rotary shaker เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชม. ทำการบ่ม negative control (rumen fluid plus anaerobic buffer medium) และ blanks (filter bags plus anaerobic buffer medium and rumen fluid) อย่างละ 4 ซ้ำ เพื่อปรับ gas production และ degradability ตามลำดับ ทำการวัด head space gas production (GP) ที่เกิดจากการหมักย่อย substrate ที่ 3, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชม. หลังการบ่ม วัด GP โดยการสอดเข็มขนาด 23 gauge (0.6 mm) ที่ต่อกับ pressure transducer และต่อเชื่อมกับ visual display หลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. นำขวด 4 ใบต่อกลุ่มการทดลอง ออกจากตู้บ่ม วัด gas pressure วางขวดลงในน้ำเย็นเพื่อหยุดกระบวนการหมัก แปลงค่า gas pressure เป็น gas volume โดยใช้สมการที่รายงานไว้โดย Mauricio et al. (1999)

$$\text{Gas volume} = 0.18 + (3.697 \times \text{gas pressure}) + (0.0824 \times \text{gas pressure}^2)$$

Total cumulative gas production ที่ 24 และ 48 ชม. คำนวณโดยรวมผลของ gas volume จากการวัดในแต่ละระยะเวลาที่ผ่านมา

5.2.4 การหาค่า pH, และ VFA ที่ 24 และ 48 ชม.

ทำการวัดค่า pH ทันทีด้วยเครื่อง pH-meter หาความเข้มข้นของ VFA หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. หลังจากวัด gas และ pH เติม 25-% meta-phosphoric acid ปริมาตร 1 ml ลงในตัวอย่าง rumen fluid ปริมาตร 5 ml เพื่อเก็บไว้วิเคราะห์ความเข้มข้นของ VFA วิเคราะห์หาความเข้มข้นของ VFA ด้วยเครื่อง gas chromatograph (model 5890, Hewlett-Packard Lab, Palo Alto, CA) ใช้ capillary column (30 m 0.32 mm i.d., 1μm phase thickness, Zebron ZB-FAAP, Phenomenex, Torrance, CA) และ flame ionization detection อุณหภูมิของตู้อบเท่ากับ 150°C (no hold time), หลังจากนั้นเพิ่มขึ้น 20°C/นาที จนถึง 210°C ปล่อยให้อุณหภูมิคงที่เป็นเวลา 2 นาที

สำหรับอุณหภูมิของ injector เท่ากับ 225°C อุณหภูมิ detector เท่ากับ 250°C และใช้แก๊ส helium เป็น carrier

5.2.5 DM, NDF และ ADF degradability

หลังจากการบ่มที่ 24 ชม. และ 48 ชม. นำ filter bag (4 filter bags แต่ละระยะเวลา และ treatment) ออกจากขวด ล้างภายใต้น้ำเย็นไหลจนกระทั่งน้ำใส นำถุงไปอบที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อให้แห้งสนิท และหาค่า DM degradability จาก DM ที่หายไปจากถุง นำส่วนที่เหลือในถุงไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ NDF และ ADF การวิเคราะห์หา NDF และ ADF ใช้เครื่อง ANKOM200 Fiber analyzer ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้โดย Van Soest et al. (1991) ใช้ sodium sulfite (10 g/l NDF solution) และ heat-stable bacterial amylase (2 ml/l NDF solution) ในการวิเคราะห์หา NDF ใช้ค่า NDF และ ADF degradability คำนวณหา NDFD และ ADFD

5.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ MIXED model procedure ของ SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) วิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลอง completely randomized design ที่ประกอบด้วย enzyme additive, corn silage และ interaction ระหว่าง 2 ปัจจัย รวมอยู่ใน model เป็น fixed effects กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

5.3 ผลการทดลอง (Results)

ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่าง enzyme additives และ control ในแง่ของผลของเอนไซม์ต่อ DMD, NDFD และ ADFD นอกจากนี้ enzyme additive ทุกชนิด ให้ผลต่อ TGP เท่ากัน แต่มีผลแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่าง enzyme additive กับ control (Table 5.2) เอนไซม์ E1 และ E2 มีผลทำให้ DMD, NDFD และ ADFD สูงกว่าเอนไซม์ E3, E4 และ control ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ E3 และ E4 ให้ผลมากกว่า control ($P < 0.05$) ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่าง enzyme additives และ control ในแง่ของผลของเอนไซม์ต่อ DMD, NDFD, ADFD และ TGP เช่นกัน เอนไซม์ E1 และ E2 มีผลทำให้ DMD, NDFD และ ADFD สูงกว่า ($P < 0.05$) กลุ่มการทดลองอื่นๆ แต่เอนไซม์ E3 และ E4 ให้ผลต่อ DMD และ ADFD เช่นเดียวกับcontrol สำหรับเอนไซม์ทุกชนิดให้ผลของเอนไซม์ต่อ TGP สูงกว่า control ($P < 0.05$)

ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา ผลของ corn silage substrate มีความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่าง corn silage substrate ในแง่ของผลต่อ DMD, NDFD, ADFD และ TGP (Table 5.2) ผลิตภัณฑ์ corn silage 1 มี DMD, NDFD และ TGP สูงที่สุด ($P < 0.05$) แต่มี ADFD ต่ำที่สุด ($P < 0.05$) ในทางตรงกันข้าม corn silage 4 มี ADFD สูงที่สุด ($P < 0.05$) แต่มี DMD และ TGP ต่ำที่สุด (P

< 0.05) จากตัวแปรทั้งหมด (DMD, NDFD, ADFD และ TGP) พบว่าไม่มี enzyme × corn silage substrate interaction (P>0.05) ทั้งที่ระยะเวลาบ่ม 24 หรือ 48 ชม. (Table 5.2)

Table 5.2 Effect of enzyme (E) and corn silage on nutrient degradability (%)and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8)

	Enzyme[1]	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP	Degradability (%)			Total GP
		DM	NDF	ADF	(mL/g DM)	DM	NDF	ADF	(mL/ g DM)
Corn 1	Mean	49.0[a]	25.1[a]	8.5[c]	78.2[a]	58.7[a]	30.6[a]	15.0[c]	109.2[a]
	Control	47.5	23.5	6.6	74.8	57.9	28.1	11.2	104.0
	E1	49.7	26.3	10.7	79.2	59.8	32.2	17.6	109.2
	E2	50.1	25.7	9.8	78.8	59.1	32.3	17.9	110.4
	E3	49.4	25.1	8.7	78.8	58.4	30.3	13.7	110.9
	E4	48.2	24.7	7.0	79.5	58.4	30.1	14.5	111.1
Corn 2	Mean	42.4[b]	15.2[b]	11.5[b]	74.3[b]	51.9[b]	22.5[b]	18.5[b]	103.4[b]
	Control	41.1	12.5	8.5	69.7	50.8	20.0	15.7	97.0
	E1	42.8	16.2	14.0	77.1	52.8	23.8	21.5	106.4
	E2	43.2	16.8	13.4	75.0	52.1	23.8	19.8	104.4
	E3	42.6	15.3	11.4	74.2	51.8	22.3	18.3	105.1
	E4	42.3	14.9	10.4	75.3	51.7	22.7	17.2	104.0
Enzyme	Control	41.3[c]	15.5[c]	8.3[d]	65.8[b]	50.1[b]	22.0[c]	15.4[b]	89.6[b]
	E1	42.8[ab]	18.0[a]	12.3[a]	70.9[a]	51.8[a]	25.3[a]	19.9[a]	97.0[a]
	E2	43.3[a]	18.2[a]	12.5[a]	70.6[a]	51.7[a]	25.4[a]	20.0[a]	98.6[a]
	E3	43.0[ab]	17.3[b]	10.5[b]	70.4[a]	50.6[b]	23.4[b]	16.4[b]	97.0[a]
	E4	42.3[b]	17.1[b]	9.4[c]	70.5[a]	50.7[b]	23.6[b]	16.7[b]	97.2[a]
Corn silage SEM		0.56	0.74	0.26	2.16	0.26	0.27	0.63	2.59
Enzyme SEM		0.57	0.75	0.30	2.21	0.29	0.31	0.66	2.70
Interaction SEM		0.73	0.83	0.65	2.84	0.57	0.65	1.10	3.99
P									
Corn silage		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
Enzyme*Corn silage		0.62	0.24	0.34	0.99	0.84	0.89	0.38	0.99

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 5.1.

[a-d] Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P <0.05.

Table 5.2 Effect of enzyme (E) and corn silage on nutrient degradability (%)and total gas production (GP) from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8) (Cont.)

	Enzyme[1]	24 h				48 h			
		Degradability (%)			Total GP	Degradability (%)			Total GP
		DM	NDF	ADF	(mL/ g DM)	DM	NDF	ADF	(mL/ g DM)
Corn 3	Mean	40.4[c]	13.9[c]	9.1[c]	66.0[c]	48.2[c]	19.9[c]	16.1[c]	91.3[c]
	Control	38.8	12.5	6.9	64.1	47.2	18.7	14.5	85.9
	E1	40.4	14.3	10.6	66.8	49.2	21.5	18.6	91.3
	E2	40.6	14.4	11.7	65.9	49.0	21.6	18.2	93.3
	E3	41.5	14.0	8.1	67.1	47.6	18.8	14.6	92.6
	E4	40.6	14.1	8.2	66.3	48.1	19.1	14.6	93.4
Corn 4	Mean	38.5[d]	14.8[b]	13.4[a]	60.0[d]	45.2[d]	22.7[b]	21.2[a]	79.6[d]
	Control	38.0	13.5	11.9	54.8	44.5	21.3	20.2	71.5
	E1	38.5	15.3	14.0	60.4	45.2	23.8	22.0	81.3
	E2	39.3	15.8	15.3	62.6	46.8	24.0	23.9	86.1
	E3	38.5	14.9	13.5	61.5	44.7	22.1	19.2	79.2
	E4	38.1	14.7	12.1	60.7	44.6	22.3	22.7	79.9
Enzyme	Control	41.3[c]	15.5[c]	8.3[d]	65.8[b]	50.1[b]	22.0[c]	15.4[b]	89.6[b]
	E1	42.8[ab]	18.0[a]	12.3[a]	70.9[a]	51.8[a]	25.3[a]	19.9[a]	97.0[a]
	E2	43.3[a]	18.2[a]	12.5[a]	70.6[a]	51.7[a]	25.4[a]	20.0[a]	98.6[a]
	E3	43.0[ab]	17.3[b]	10.5[b]	70.4[a]	50.6[b]	23.4[b]	16.4[b]	97.0[a]
	E4	42.3[b]	17.1[b]	9.4[c]	70.5[a]	50.7[b]	23.6[b]	16.7[b]	97.2[a]
Corn silage SEM		0.56	0.74	0.26	2.16	0.26	0.27	0.63	2.59
Enzyme SEM		0.57	0.75	0.30	2.21	0.29	0.31	0.66	2.70
Interaction SEM		0.73	0.83	0.65	2.84	0.57	0.65	1.10	3.99
P									
Corn silage		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
Enzyme*Corn silage		0.62	0.24	0.34	0.99	0.84	0.89	0.38	0.99

[1]Enzyme E1, E2, E3 and E4 are identified in Table 4.1.

[a-d] Mean within the same column for the main effects of enzyme or does having different letters are different at P <0.05.

ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. ไม่พบความแตกต่าง (P > 0.05) ระหว่าง enzyme additive และ control ในแง่ของผลของเอนไซม์ต่อ total VFA, molar proportions ของ acetate, propionate, butyrate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate (Table 5.3) ส่วนผลของ corn silage

substrate พบความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่าง corn silage substrate ในแง่ของผลต่อตัวแปรทั้งหมด ได้แก่ total VFA, molar proportions ของ acetate, propionate, butyrate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate (Table 5.3) ผลิตภัณฑ์ corn silage 2 ให้ total VFA สูงกว่า ($P < 0.05$) corn silage อีก 3 ชนิด corn silage 2 และ corn silage 3 ให้ molar proportion ของ acetate สูงกว่า ($P < 0.05$) corn silage 1 และ corn silage 4 แต่ corn silage 1 และ corn silage 4 ให้ molar proportion ของ propionate สูงกว่า ($P < 0.05$) corn silage 2 and corn silage 3 ในขณะที่ corn silage 1 และ corn silage 2 มี molar proportion ของ butyrate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate สูงที่สุด ($P<0.05$) ตามลำดับ สำหรับ corn silage 1, corn silage 2 และ corn silage 3 ในส่วนของ molar proportion ของ acetate, propionate, butyrate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate ไม่พบว่ามี enzyme × corn silage substrate interaction ($P > 0.05$) แต่สำหรับ corn silage 1 และ corn silage 2 ผลของเอนไซม์ต่อ total VFA ขึ้นอยู่กับ enzyme additive (enzyme × corn silage interaction, $P < 0.05$) ส่วน corn silage 4 ในส่วนของ molar proportion ของ acetate, butyrate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate ไม่พบว่ามี enzyme × corn silage substrate interaction ($P > 0.05$) แต่ ผลของเอนไซม์ต่อ total VFA และ molar proportion ของ propionate ขึ้นอยู่กับ enzyme additive (enzyme × corn silage interaction, $P < 0.05$)

ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ไม่พบความแตกต่าง ($P > 0.05$) ระหว่าง enzyme additives และ control เกี่ยวกับผลของเอนไซม์ต่อ molar proportion ของ acetate, propionate, butyrate, และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate แต่ enzyme additives มีผลทำให้มีความแตกต่าง ($P < 0.05$) ต่อ total VFA (Table 5.3) เอนไซม์ E3 และ E4 ส่งผลให้มี total VFA สูงกว่า control ($P < 0.05$) ในขณะที่เอนไซม์ E3 ส่งผลให้มี total VFA ($P < 0.05$) สูงที่สุด สำหรับผลของ corn silage substrate พบว่ามีความแตกต่าง ($P < 0.05$) ระหว่าง corn silage substrate เกี่ยวกับผลของ corn silage ต่อทุกๆ ตัวแปร ได้แก่ total VFA, molar proportions ของ acetate, propionate, butyrate, และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate (Table 5.3)

สำหรับ corn silage 4 ส่งผลให้มี total VFA ต่ำที่สุด คือต่ำกว่า corn silage ทั้ง 3 ชนิด ($P<0.05$) ส่วน corn silage 3 และ corn silage 4 ส่งผลให้มี molar proportion ของ acetate สูงกว่า corn silage 1 และ corn silage 2 ($P < 0.05$), แต่ corn silage 1 และ corn silage 2 ส่งผลให้มี molar proportions ของ propionate และ butyrate สูงที่สุด ($P<0.05$) ตามลำดับ ในส่วนของ corn silage 3 และ corn silage 4 ส่งผลให้มีสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate สูงกว่า corn silage 1 และ corn silage 2 ($P < 0.05$) สำหรับ corn silage ทุกชนิด และผลต่อ total VFA และ molar proportion ของ butyrate พบว่าไม่มี enzyme × corn silage substrate interaction ($P>0.05$) แต่สำหรับ corn silage 3 และ corn silage 4 ผลของเอนไซม์ต่อ molar proportion ของ

acetate ขึ้นอยู่กับชนิดของ enzyme additive (enzyme × corn silage interaction, $P<0.05$) จาก corn silage substrate ทุกชนิด ผลของเอนไซม์ต่อ molar proportion ของ propionate และสัดส่วน acetate ต่อ propionate ขึ้นอยู่กับชนิดของ enzyme additive (enzyme × corn silage interaction, $P<0.05$)

Table 5.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8)

		24 h					48 h				
	Enzyme	Total VFA (mM)	Molar proportions[2] Ac	Pr	Bu	Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2] Ac	Pr	Bu	Ac:Pr
Corn 1	Mean	108.9^{B}	58.9^{B}	18.9^{A}	13.3^{A}	3.12^{C}	125.4^{A}	56.1^{C}	20.3^{A}	13.7^{B}	2.79^{C}
	Control	105.7^{b}	58.5	18.5	13.9	3.16	121.8	55.8	20.8^{a}	14.3	2.69^{b}
	E1	115.9^{a}	58.8	18.9	13.5	3.12	128.1	56.5	20.0^{b}	14.2	2.80^{ab}
	E2	109.2^{ab}	59.0	18.9	13.2	3.13	127.1	56.2	20.2^{b}	14.3	2.85^{a}
	E3	109.3^{b}	59.3	19.2	12.8	3.10	123.9	55.7	20.4^{ab}	14.5	2.74^{ab}
	E4	108.5^{ab}	59.1	19.1	13.1	3.10	126.3	56.4	20.0^{b}	14.3	2.84^{a}
Corn 2	Mean	112.5^{A}	61.6^{A}	16.3^{C}	12.7^{B}	3.79^{A}	123.1^{A}	59.0^{B}	18.1^{B}	14.4^{A}	3.27^{B}
	Control	114.3^{ab}	61.5	15.9	12.8	3.88	122.8	59.5	17.6^{b}	13.7	3.40^{a}
	E1	119.9^{a}	61.9	16.5	12.6	3.77	121.6	58.8	18.4^{a}	13.6	3.21^{b}
	E2	108.9^{b}	61.8	16.4	12.7	3.80	119.5	58.9	18.0^{ab}	13.8	3.31^{ab}
	E3	105.4^{b}	61.3	16.3	12.9	3.76	125.2	58.7	18.3^{a}	13.7	3.22^{b}
	E4	110.1^{b}	61.6	16.6	12.7	3.73	126.2	59.0	18.4^{a}	13.5	3.22^{b}
Enzyme	Control	103.3	60.3	17.8	12.6	3.43	117.9^{C}	58.5	18.6	13.5	3.19
	E1	107.8	60.5	18.1	12.4	3.38	120.1^{BC}	58.6	18.5	13.5	3.21
	E2	106.1	60.7	18.0	12.3	3.40	122.9^{ABC}	58.8	18.4	13.5	3.24
	E3	104.4	60.8	17.9	12.3	3.41	125.0^{A}	59.0	18.3	13.5	3.28
	E4	105.2	60.6	18.0	12.4	3.40	124.4^{AB}	59.0	18.3	13.4	3.26
Corn silage SEM		5.82	0.23	0.38	0.28	0.100	2.12	1.23	1.24	0.18	0.292
Enzyme SEM		5.86	0.24	0.04	0.28	0.101	2.26	1.23	1.24	0.19	0.292
Interaction SEM		6.29	0.37	0.44	0.36	0.113	3.83	1.26	1.25	0.24	0.30
P											
Corn silage		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme		0.17	0.20	0.46	0.49	0.77	0.03	0.11	0.23	0.89	0.11
Corn silage*Enzyme		0.01	0.34	0.03	0.36	0.11	0.96	0.03	<0.001	0.17	<0.001

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[a-d]Means within the same columns within substrate having different letters are different at P < 0.05.

[A,B,C, D]Mean within the same column for the main effects of enzyme or substrate having different letters are different at P < 0.05.

Table 5.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8) (Cont.)

	Enzyme	24 h					48 h				
		Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (mM)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
Corn 3	Mean	104.7^{C}	61.6^{A}	17.4^{B}	12.0^{C}	3.54^{B}	123.3^{A}	60.0^{A}	17.5^{C}	13.1^{C}	3.45^{A}
	Control	102.8	61.7	17.0	12.2	3.63	116.6	59.2^{b}	17.5^{ab}	13.6	3.41^{b}
	E1	103.3	61.1	17.4	12.2	3.52	120.7	59.8^{b}	17.9^{a}	13.0	3.36^{b}
	E2	108.1	61.6	17.6	11.9	3.52	124.9	60.0^{ab}	17.6^{ab}	13.0	3.43^{ab}
	E3	105.3	61.9	17.5	11.8	3.55	128.0	60.8^{a}	17.2^{b}	12.8	3.58^{a}
	E4	103.6	61.4	17.6	12.0	3.50	126.5	60.2^{ab}	17.5^{ab}	13.0	3.47^{ab}
Corn 4	Mean	95.4^{D}	60.4^{B}	19.1^{A}	11.5^{D}	3.16^{C}	116.4^{B}	59.9^{A}	17.6^{C}	12.8^{D}	3.43^{A}
	Control	90.4^{b}	59.6	19.6^{a}	11.4	3.04	110.5	59.5^{b}	18.3^{a}	12.6	3.27^{c}
	E1	91.9^{ab}	60.3	19.1^{a}	11.3	3.09	114.0	59.4^{b}	17.7^{b}	13.1	3.38^{bc}
	E2	97.9^{a}	60.5	19.2^{ab}	11.5	3.15	119.0	59.9^{ab}	17.7^{b}	12.8	3.42^{ab}
	E3	98.0^{a}	60.5	18.7^{b}	11.8	3.24	119.9	60.6^{a}	17.1^{b}	12.7	3.56^{a}
	E4	98.6^{a}	61.0	18.6^{b}	11.6	3.29	118.6	60.3^{ab}	17.3^{b}	12.7	3.51^{ab}
Enzyme	Control	103.3	60.3	17.8	12.6	3.43	117.9^{C}	58.5	18.6	13.5	3.19
	E1	107.8	60.5	18.1	12.4	3.38	120.1^{BC}	58.6	18.5	13.5	3.21
	E2	106.1	60.7	18.0	12.3	3.40	122.9^{ABC}	58.8	18.4	13.5	3.24
	E3	104.4	60.8	17.9	12.3	3.41	125.0^{A}	59.0	18.3	13.5	3.28
	E4	105.2	60.6	18.0	12.4	3.40	124.4^{AB}	59.0	18.3	13.4	3.26
Corn silage SEM		5.82	0.23	0.38	0.28	0.100	2.12	1.23	1.24	0.18	0.292
Enzyme SEM		5.86	0.24	0.04	0.28	0.101	2.26	1.23	1.24	0.19	0.292
Interaction SEM		6.29	0.37	0.44	0.36	0.113	3.83	1.26	1.25	0.24	0.30
P											
Corn silage		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme		0.17	0.20	0.46	0.49	0.77	0.03	0.11	0.23	0.89	0.11
Corn silage*Enzyme		0.01	0.34	0.03	0.36	0.11	0.96	0.03	<0.001	0.17	<0.001

[2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[a-d]Means within the same columns within substrate having different letters are different at P < 0.05.

[A,B,C, D]Mean within the same column for the main effects of enzyme or substrate having different letters are different at P < 0.05.

5.4 วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทางการค้าที่มี xylanase และ endoglucanase activities หลากหลาย การวิเคราะห์หา enzyme activity ใช้ระดับ pH 6 และอุณหภูมิ 39 °C ตามที่แนะนำโดย Colombatto and Beauchemin (2003) เพื่อสะท้อนถึงสภาวะปกติในกระเพาะหมักของโคนมที่ได้รับทั้งอาหารข้นและอาหารหยาบ สารเสริมเอนไซม์แต่ละชนิดมี activity หลากหลายทั้ง endoglucanase และ xylanase ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ (Beauchemin et al., 2004) อุณหภูมิ และ substrate (Colombatto and Beauchemin, 2003) และระดับ pH (Kung et al., 2002) Kung et al. (2002) รายงานว่าความแตกต่างของ activity profiles เมื่อวิเคราะห์ที่ระดับ pH ที่แตกต่างกัน และแนะนำว่า ผลของ pH ต่อ enzyme activity อาจเป็นปัจจัยสำคัญ เมื่อต้องการจำแนก fibrolytic enzyme สำหรับใช้ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง

การศึกษาครั้งได้ออกแบบเพื่อประเมินผลการใช้ระดับการเสริม 2 ระดับ ของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ 4 ชนิด เพื่อปรับปรุงการย่อยสลายของ corn silage 4 ชนิด โดยใช้ *in vitro* techniques วิธีการนี้สามารถใช้อย่างเชื่อถือได้ในการวิเคราะห์โดยชีววิธี เพื่อทำนายผลตอบสนอง *in vivo* ต่อ exogenous enzymes โครงการนี้มุ่งสนใจศึกษา corn silages เพราะใช้เลี้ยงโคในหลายภูมิภาคของโลก และในคุณค่าทางโภชนะค่อนข้างสูง แต่ corn silage ในที่ต่างๆ มีคุณภาพแตกต่างกัน ความแตกต่างในองค์ประกอบของ NDF, ADF และ starch ระหว่าง corn silages อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของระยะการเจริญเติบโตและชิ้นส่วนของต้นข้าวโพด การเสริม fibrolytic enzyme additive สามารถเพิ่ม DMD, DNDF, ADF, และ TGP ของ corn silages ทั้ง 4 ชนิด ที่ระยะเวลาบ่มที่ 24 และ 48 ชม. อย่างไรก็ตาม degradability ของ corn silage ตอบสนองต่อชนิดของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่าเอนไซม์อีก 2 ชนิด ทำนองเดียวกัน Eun et al. (2007) รายงานในการศึกษา *in vitro* ว่า degradability ของ NDF และ ADF จาก alfalfa hay และ corn silage เพิ่มขึ้นเมื่อเสริม fibrolytic enzyme additive แต่ผลตอบสนองผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม สารเสริมเอนไซม์ทางการค้าแต่ละชนิดให้ผลที่แตกต่างกัน กล่าวคือ สารเสริมเอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่าสารเสริมเอนไซม์ E3 และ E4 ส่วนผลของ corn silage substrate พบว่ามีความแตกต่างระหว่าง corn silage substrate เกี่ยวกับผลต่อ DMD, NDFD, ADFD และ TGP ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบระหว่าง corn silage ที่ใช้ในการศึกษา corn silage 1 มี DMD และ TGP สูงที่สุด เพราะว่า corn silage 1 มีองค์ประกอบของแป้งมากกว่า corn silage อีก 3 ชนิด สำหรับตัวแปรที่ทำการศึกษาทั้งหมด ได้แก่ DMD, NDFD, ADFD และ TGP พบว่าไม่มี enzyme × corn silage substrate interaction ทั้งที่ระยะเวลาบ่ม 24 หรือ 48 ชม. ผลของการศึกษาครั้งนี้แนะนำว่า ผลตอบสนองต่อ fibrolytic enzyme additive ของ corn silage ทั้ง 4 ชนิดนั้นเหมือนกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า fibrolytic enzyme additive ไม่มีผลต่อ total

VFA และ molar proportions ของ VFA แต่ละชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Chung et al. (2012) ในการศึกษาที่เสริม enzyme ในอาหาร ไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของ total VFA และ molar proportions ของ VFA แต่ละชนิด ใน ruminal fluid อย่างไรก็ตาม ผลของ corn silage substrate มีความแตกต่างระหว่าง corn silage substrate เกี่ยวกับ total VFA และ molar proportions ของ VFA แต่ละชนิด เพราะว่า proportion ของ ruminal VFA สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโภชนะในกระเพาะหมัก Phakachoed et al. (2013) แนะนำว่า การวิเคราะห์ผลของ enzyme ต่อความเข้มข้นของ VFA อาจไม่ใช่วิธีที่เป็นประโยชน์ในการจำแนกแยกแยะศักยภาพของผลของ the enzyme additives *in vivo*

5.5 สรุป (Conclusions)

ผลิตภัณฑ์ enzyme additive ทุกชนิด ให้ผลในทางบวก โดยสามารถเพิ่ม DMD, NDFD, ADFD และ TGP ในทุก corn silage อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่าเอนไซม์ E3 และ E4 ในขณะที่ corn silage1 มีผลทำให้มี DMD, NDFD และ TGP สูงที่สุด ในขณะที่ corn silage 4 มีผลทำให้มี ADFD สูงที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Arriola, K. G., S. C. Kim, C. R. Staples, and A. T. Adesogan. (2011). Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 94, 832-841.

Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P. Morgavi, and W. Z. Yang. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81(E. Suppl. 2), E37-E47.

Beauchemin, K. A., D. Colombatto, and D. P. Morgavi. (2004). A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84, 23-36.

Chung, Y. H., M. Zhou, L. Holtshausen, T. W. Alexander, T. A. McAllister, L. L. Guan, M. Oba, and K. A. Beauchemin. (2012). A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric methane emissions. J. Dairy Sci. 95, 1419–1427.

Colombatto, D., and K. A. Beauchemin. (2003). A proposed methodology to standardize the determination of enzymic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 83, 559-568.

Colombatto, D., D. P. Morgavi, A. F. Furtado, and K. A. Beauchemin. (2003). Screening of exogenous enzymes for ruminant diet: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. J. Anim. Sci. 81, 2628–2638.

Eun, J. S., K. A. Beauchemin, and H. Schulze. (2007). Use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance in vitro fermentation of alfalfa hay and corn silage. J. Dairy Sci. 90, 1440–1451.

Goering, H. K., and P. J. Van Soest. (1970). Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

Holtshausen, L., Y. H. Chung, H. Gerardo Cuervo, M. Oba, and K. A. Beauchemin. (2011). Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. J. Dairy Sci. 94, 899–907.

Kung, Jr., L., M. A. Cohen, L. M. Rode, and R. J. Treacher. (2002). The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ratio to lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85, 2396-2402.

Mauricio, R.M., F.L. Mould, M.S. Dhanoa, E. Owen, K.S. Channa, and M.K. Theodorou. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Technol. 79, 321-330.

Nsereko, V. L., K. A. Beauchemin, D. P. Morgavi, L. M. Rode, A. F. Furtado, T. A. McAllister, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, and Y. Wang. (2002). Effect of a fibrolytic enzyme preparation from Trichoderma longibrachiatum on the rumen microbial population of dairy cows. Can. J. Microbiol. 48, 14–20.

Phakachoed, N., P. Lounglawan, and W. Suksombat, (2013). Effects of xylanase supplementation on ruminal digestibility in fistulated non-lactating dairy cows fed rice straw. Livest. Sci. 149, 104–108.

Phakachoed, N., W. Suksombat, D. Colombatto, K.A. Beauchemin. (2013). Use of fibrolytic enzymes additives to enhance in vitro ruminal fermentation of corn silage. Livest. Sci. 157, 100–112.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis, (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal production. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.

Yang, H. J., and C. Y. Xie. (2010). Assessment of fibrolytic activities of 18 commercial enzyme products and their abilities to degrade the cell wall fraction of corn stalks in in vitro enzymatic and ruminal batch cultures. Anim. Feed Sci. Technol. 159, 110-121.

บทที่ 6

ผลของการใช้ exogenous fibrolytic enzyme ต่อการหมักย่อยฟางข้าว *in vitro*

(Effects of exogenous fibrolytic enzymes on *in vitro* ruminal fermentation of rice straw)

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินผลของ 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. นั่นคือทุกระดับการเสริมเอนไซม์จะส่งผลให้มี total VFA สูงกว่า control ($P<0.001$) สรปโดยรวม enzyme additives แสดงผลตอบสนองในเชิงบวกของ rice straw substrates (เพิ่ม NDFD และ ADFD) อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E3 มีประสิทธิภาพมากกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ชนิดอื่นๆ

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects of 8 enzyme additives on ruminal fermentation of rice straw 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 all enzyme additives were commercial products that provided a range in endoglucanase, exoglucanase, and xylanase activities. The eight enzymes were added at 0, 2 and 4 μl/g of rice straw 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), and acid detergent fiber (ADFD) were determined after 24 and 48 h. After 24 h incubation, degradabilities of DM, NDF, and total gas production (TGP) were not affected by enzyme additives, however degradability of ADF was increased by enzyme additives ($P<0.05$). After 48 h incubation, the effects of enzyme additives on degradability of DM and TGP were also similar ($P>0.05$). But degradability of NDF were increased ($P<0.05$) by enzyme additives. At both time points, there were difference ($P<0.05$) between enzyme additives in terms of their effects on degradability of ADF. The supplemental exogenous fibrolytic enzymes increased in vitro degradation of rice straw, but in each enzyme product shows different response dependent on enzyme dose (enzyme × dose interaction, $P<0.05$). There were differences amongst the additives for total VFA at 24 and 48 h ($P<0.05$); increasing enzyme dose increased total VFA after 24 and 48 h, such that all doses were higher than the control ($P<0.001$). Overall, enzyme additives show positive response in rice straw substrates (increased, NDFD and ADFD), however, product E3 was more effective than other products.

6.1 บทนำ (Introduction)

ฟางข้าวเป็นผลพลอยได้จากการผลิตข้าวที่มีมากและใช้เป็นแหล่งอาหารหยาบหลักอย่างกว้างขวางในประเทศไทย ทั้งนี้เพราะว่าอาหารหยาบคุณภาพดีนั้นมักมีราคาสูง และอาหารหยาบคุณภาพดีนั้นมีอยู่อย่างจำกัด อย่างไรก็ตาม ฟางข้าวมีองค์ประกอบของ lignocellulosic อยู่สูง มีองค์ประกอบของโปรตีนต่ำ มีความน่ากินต่ำ และมีการย่อยสลายได้ของอินทรียวัตถุในกระเพาะหมักต่ำ (Jung et al., 1993) การเพิ่มการย่อยได้ของอาหารคุณภาพต่ำโดยการใช้ enzyme feed additives สามารถนำไปสู่การปรับปรุงผลผลิตสัตว์อย่างมีนัยสำคัญในหลายภูมิภาคของโลก อย่างไรก็ตาม enzyme activities ของ feed enzymes ที่ทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่ควบคุมได้อย่างเหมาะสมไม่สามารถทำนายความสามารถของเอนไซม์ในการเพิ่มการย่อยอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (McAllister et al., 2001) ดังนั้นก่อนการใช้ enzyme additive ในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ต้องทดสอบผลของการใช้ enzyme feed additive และคัดกรองผลิตภัณฑ์เอนไซม์ และหาระดับการเสริมที่เหมาะสมในสภาวะของกระเพาะหมัก (Colombatto and Beauchemin, 2003) ส่วนหนึ่งของการศึกษานี้มุ่งสนใจวิธีการ

in vitro screening โดยใช้ฟางข้าวเป็น substrate ก่อนที่จะนำเอนไซม์ไปทดสอบต่อไปในการศึกษา *in vivo* ที่ใช้อาหารที่มีฟางข้าวเป็นส่วนประกอบ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินศักยภาพของ enzyme additives หลายชนิด ที่มี enzyme activities แตกต่างกัน เพื่อเพิ่ม *in vitro* ruminal fiber degradation และ fermentation profile ของฟางข้าว และหาระดับการเสริมที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด

6.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and method)

การทดลองนี้ดำเนินการตามแบบแผน completely randomized design ประกอบด้วย 2 runs (batches) และมีจำนวน 4 ซ้ำต่อ run และแต่ละ run ทำแยกกันคนละวัน

6.2.1 การเตรียม reagents (Reagents preparation)

ในการเตรียม reagents ได้แก่ buffer solution, macromineral solution, micromineral solution, 0.1% (wt/vol) Resazurin และการเตรียม Medium เตรียมเช่นเดียวกันกับที่ได้รายงายไว้ในบทที่ 5

6.2.2 การเตรียม substrate และ enzyme

ทำการอบตัวอย่างฟางข้าวที่อุณหภูมิ 55°C จนกระทั่งแห้ง (~48 ชม.) และบดด้วยเครื่องบด (Wiley mill standard model 4, Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA, USA) ผ่านตะแกรงขนาด 1 mm ชั่งฟางข้าวบดประมาณ 0.9 g DM บรรจุลงใน filter bag ที่ผ่านการล้างด้วย acetone และชั่งน้ำหนักแล้ว (F57, Ankom Technology, Macedon, NY) เตรียมจำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละ treatment และในแต่ละระยะเวลาบ่มใน batch culture เจือจางผลิตภัณฑ์เอนไซม์ด้วยน้ำ และเติม (200 µl) ลงบน substrates (rice straw) โดยตรงใน filter bag (ก่อนปิดปากถุง) ที่ระดับการเสริม 3 ระดับ ของเอนไซม์แต่ละชนิด: 0 (control), 2 และ 4 µl/g of substrate DM ปิดปากถุงด้วย heat-sealed และบรรจุลงในชวดขนาดปริมาตร 125 ml และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชม.

6.2.3 In vitro fermentations

เช่นเดียวกับที่ได้รายงานไว้ในบทที่ 5

6.2.4 Determination of pH, and VFA at 24 and 48 h

เช่นเดียวกับที่ได้รายงานไว้ในบทที่ 5

6.2.5 Statistical analysis

เช่นเดียวกับที่ได้รายงานไว้ในบทที่ 5

6.3 ผลการทดลอง (Results)

6.3.1 Enzyme activity

คำนวณ enzymes activity ตามพื้นฐานของ activity ที่วัดได้ที่สภาวะที่เหมาะสมในการบ่มในกระเพาะหมัก enzyme additive ทุกชนิด มี xylanase, endo-glucanase และ exo-glucanase activity และ amylase ยกเว้นเพียงเอนไซม์ E1 และ E7 ที่ไม่มี amylase activity (Table 6.1) สำหรับ xylanase activity ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิด (per ml) จัดเรียงลำดับได้ดังนี้ E6>E8>E5>E2>E7>E1>E3>E4 วัด enzyme activity โดยใช้ xylan substrate (oat spelt) ส่วน endo-glucanaseand activity ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิด (per ml) จัดเรียงลำดับได้ดังนี้ E2>E8>E1>E5>E6>E3>E7>E4 การวัด enzyme activity ใช้ cellulose substrate (medium-viscosity carboxymethylcellulose) ดังนั้นเอนไซม์ E6 เป็นเอนไซม์ที่มีแหล่งที่มีความเข้มข้นของ xylanase สูงที่สุด และเอนไซม์ E2 E6 เป็นเอนไซม์ที่มีแหล่งที่มีความเข้มข้นของ endo-glucanase สูงที่สุด ในขณะที่เอนไซม์ E4 เป็นผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด

Table 6.1 Enzyme activity of the 8 enzyme additives (pH 6.5)

Enzyme product	Enzymatic activity[1]			
	Xylanase	Endoglucanase	Exoglucanase	Amylase
Dyadic (E1)	1457±20	250±26	11±0.8	-
Econase (E2)	2820±124	265±18	7±0.4	0.6
Rovabio (E3)	880±42	106±6	6±0.9	0.5
Cinabio (E4)	156±16	28±0.5	2±0.4	0.1
EL2012 059L (E5)	2903±71	230±25	7±0.6	1.4
EL2012 060L (E6)	3347±34	209±12	10±1	0.5
EL2012 062L (E7)	2741±81	53±6	4±0.3	-
EL2012 063L (E8)	3246±59	263±1	8±0.9	2.0

[1]Endoglucanase, exoglucanase and amylase activitywere expressed as μmoles of glucose released per minuteper millilitre enzyme.

Xylanase activity was expressed as μmoles of xylose released per minute per millilitre enzyme.

6.3.2 In vitro fermentation

หลังจากการบ่ม 24 ชม. degradability ของ DM, NDF และ TGP ไม่มีผลกระทบจาก enzyme additives อย่างไรก็ตาม enzyme additives สามารถเพิ่ม degradability ของ ADF ($P<0.05$) (Table 6.2) หลังจากการบ่ม 48 ชม. ผลของ enzyme additives ต่อ degradability ของ DM และ TGP ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่ degradability ของ NDF เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) เนื่องจากการ

เสริม enzyme additives ที่ระยะเวลาบ่ม ทั้ง 2 เวลา พบว่ามีความแตกต่าง ($P<0.05$) ระหว่าง enzyme additives เกี่ยวกับผลต่อ degradability ของ ADF

ที่ 48 ชม. หลังการบ่ม E3 ส่งผลให้มี NDF degradability สูงที่สุด ในทางตรงกันข้าม NDF degradability ต่ำสุดเมื่อใช้เอนไซม์ E4 ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา E3 มีผลทำให้ ADF degradability สูงที่สุด แต่ ADF degradability ต่ำสุดใน E5 สำหรับตัวแปรทั้งหมด DMD, NDFD, ADFD และ TGP ล้วนเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ control ที่ 24 และ 48 ชม. หลังการบ่ม ในทางตรงกันข้าม ผลของ enzyme dose ต่อ DM degradability เหมือนกัน ($P>0.05$) ระหว่าง control และ enzyme dose ที่ 24 ชม. หลังการบ่ม ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา ผลของ enzyme dose ต่อ DM degradability และ TGP ไม่มีปฏิสัมพันธ์ของ enzyme × dose ($P>0.05$) และ NDF degradability ไม่มี enzyme × dose interaction ($P>0.05$) เช่นกัน ที่หลังจากการบ่ม 24 ชม.

ที่ 48 ชม. หลังการบ่ม ผลของ enzyme dose ต่อ NDF degradability ขึ้นอยู่กับ enzyme additive (enzyme × dose interaction, $P<0.05$) ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา ผลของ enzyme dose ต่อ ADF degradability ขึ้นอยู่กับ enzyme additive (enzyme × dose interaction, $P<0.05$) ที่ 24 ชม. หลังการบ่มเอนไซม์ E2, E3, E6 และ E7 ทุกระดับของ enzyme dose เพิ่ม ADF degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($P<0.05$) โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับการเสริมเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์ E1 ทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม ADF degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($P<0.05$) และที่ระดับการเสริม 4 µl/g DM จะเพิ่มสูงกว่าที่ระดับการเสริม 2 µl/g DM สำหรับเอนไซม์ E4, ADF degradability จะเท่ากัน ($P>0.05$) ทุกระดับการเสริมเมื่อเปรียบเทียบกับ control ส่วนเอนไซม์ E5 และ E8, ADF degradability ที่ระดับการเสริม 2 µl/g DM สูงกว่า control แต่ที่ระดับการเสริมสูงสุด (4 µl/g DM) จะเท่ากับ control ($P>0.05$)

ที่ 48 ชม. หลังการบ่ม เอนไซม์ E1, E2, E3, E4, E7 และ E8 ทุกระดับการเสริม สามารถเพิ่ม NDF degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับของการเสริมเอนไซม์ ส่วนเอนไซม์ E6, ทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม NDF degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($P<0.05$) แต่ NDF degradability ที่ระดับการเสริม 4 µl/g DM จะสูงกว่าที่ระดับการเสริม 2 µl/g DM สำหรับเอนไซม์ E5, ผลตอบสนองของ NDF degradability ต่อระดับการเสริม ที่ 2 µl/g DM จะสูงกว่า ($P<0.05$) control แต่ที่ระดับการเสริมสูงสุด (4 µl/g DM) ไม่แตกต่างจาก control ($P>0.05$)

สำหรับเอนไซม์ E1, E2, E3, E6, E7 และ E8 ที่ทุกระดับการเสริมสามารถเพิ่ม NDF degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control ($P<0.05$) โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับของการเสริม ส่วนเอนไซม์ E4 และ E5, มี ADF degradability เท่ากัน ($P>0.05$) ในทุกระดับการเสริมเมื่อเปรียบเทียบกับ control

Table 6.2 Effect of enzyme (E) and dose (D) on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and total gas production (GP) from rice straw after 24 and 48 h of incubation with ruminal fluid

		24 h				48 h			
	Level	Degradability (%)			Total GP	Degradability (%)			Total GP
	µL/gDM	DM	NDF	ADF	mL/gDM	DM	NDF	ADF	mL gDM
	0	24.8	11.4	10.3^{c}	49.1	31.6	20.5^{c}	20.9^{b}	75.6
E1	2	25.1	13.6	12.5^{b}	52.4	32.4	24.0^{a}	23.4^{a}	84.4
	4	25.2	14.9	14.2^{a}	52.6	32.3	24.2^{a}	24.0^{a}	83.8
	Mean	**25.0**	**13.3**	**12.3^{A}**	**51.4**	**32.1**	**22.9^{B}**	**22.8^{BC}**	**81.2**
E2	2	24.3	13.3	12.2^{a}	50.3	32.0	24.3^{a}	23.2^{a}	79.7
	4	25.5	14.4	13.5^{a}	54.6	33.5	23.8^{a}	24.4^{a}	86.4
	Mean	**24.8**	**13.0**	**12.0^{AB}**	**51.3**	**32.4**	**22.9^{B}**	**22.8^{BC}**	**80.5**
E3	2	25.2	12.9	13.6^{a}	56.4	34.7	25.9^{a}	26.5^{a}	91.3
	4	25.1	13.9	13.3^{a}	54.3	33.9	26.4^{a}	27.1^{a}	85.3
	Mean	**25.0**	**12.7**	**12.4^{A}**	**53.3**	**33.4**	**24.3^{A}**	**24.8^{A}**	**84.1**
E4	2	25.0	12.1	10.9^{c}	52.4	31.6	22.3^{a}	21.9^{b}	83.0
	4	24.6	12.9	10.9^{c}	51.9	32.5	22.8^{a}	22.5^{b}	83.1
	Mean	**24.8**	**12.2**	**10.7^{C}**	**51.1**	**31.9**	**21.9^{C}**	**21.8^{CD}**	**80.6**
E5	2	25.4	14.4	13.1^{b}	53.2	31.6	22.3^{b}	21.4^{b}	79.4
	4	25.1	12.8	11.3^{c}	52.2	31.5	22.1^{bc}	22.4^{b}	78.6
	Mean	**25.1**	**12.9**	**11.6^{AB}**	**51.5**	**31.6**	**21.6^{C}**	**21.6^{D}**	**77.9**
E6	2	25.2	12.9	12.5^{a}	53.1	32.2	23.5^{b}	24.3^{a}	82.5
	4	24.7	12.8	12.0^{a}	53.7	34.0	26.2^{a}	26.0^{a}	86.2
	Mean	**24.9**	**12.4**	**11.6^{AB}**	**51.9**	**32.6**	**23.4^{AB}**	**23.7^{AB}**	**81.4**
E7	2	25.1	13.7	12.7^{a}	53.3	32.2	24.5^{a}	24.5^{a}	81.5
	4	24.6	13.2	12.2^{a}	55.7	33.1	23.7^{a}	24.1^{a}	85.1
	Mean	**24.8**	**12.8**	**11.7^{AB}**	**52.7**	**32.3**	**22.9^{B}**	**23.2^{B}**	**80.7**
E8	2	24.7	13.4	11.9^{b}	52.9	32.8	23.9^{a}	24.0^{a}	82.8
	4	24.0	13.4	11.7^{bc}	51.9	31.6	23.4^{a}	22.9^{a}	80.9
	Mean	**24.5**	**12.7**	**11.3^{BC}**	**51.3**	**32.0**	**22.6^{BC}**	**22.6^{BCD}**	**79.7**
S.E.M.		0.61	1.14	1.03	2.14	1.45	1.47	0.91	4.30
Dose	0	24.8	11.4^{B}	10.3^{B}	49.1^{B}	31.6^{B}	20.5^{B}	20.2^{B}	75.6^{B}
	2	25.0	13.3^{A}	12.4^{A}	53.0^{A}	32.4^{A}	23.8^{A}	23.6^{A}	83.1^{A}
	4	24.8	13.5^{A}	12.4^{A}	53.4^{A}	32.8^{A}	24.1^{A}	24.0^{A}	83.7^{A}
P-values									
Enzyme		0.87	0.21	0.003	0.26	0.25	<0.001	<0.001	0.33
Dose		0.60	<0.001	<0.001	<0.001	0.02	<0.001	<0.001	<0.001
Enzyme*Dose		0.93	0.28	0.04	0.35	0.71	0.008	0.01	0.69

$^{a\ b\ c}$ Means within the same column within enzyme having different letters are different at P<0.05.

$^{A\ B\ C\ D}$ Mean within the same column for enzyme and does having different letters are different at P<0.05.

ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. total VFA, molar proportion ของ acetate และสัดส่วนของ acetate ต่อ propionate ของเอนไซม์ E8 จะสูงกว่า (P<0.05) เอนไซม์อื่นๆ (Table 6.3) เปรียบเทียบกับ control ระดับการเสริมเอนไซม์ มีผลต่อ total VFA, molar proportion ของ acetate และสัดส่วน acetate ต่อ propionate ที่ระดับการเสริม 2 และ 4 µl/g DM สามารถเพิ่ม total VFA และ molar proportion ของ acetate (P<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างระดับการเสริม สัดส่วนของ propionate ไม่มีผลกระทบระหว่างชนิดของ enzyme additives และ enzyme dose (P>0.05) สัดส่วนของ butyrate ไม่มีผลกระทบระหว่าง enzyme additives (P>0.05) อย่างไรก็ตาม enzyme doses สามารถเพิ่มสัดส่วนของ butyrate เมื่อเปรียบเทียบกับ control (P<0.05) สำหรับตัวแปรทั้งหมดที่ทำการศึกษา ได้แก่ total VFA, molar proportion ของ acetate, propionate, butyrate และสัดส่วน acetate ต่อ propionate ไม่มี enzyme × dose interaction (P>0.05)

ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ผลของเอนไซม์ต่อ total VFA, molar proportion ของ acetate และสัดส่วน acetate ต่อ propionate มีความแตกต่างกัน (P<0.05) (Table 6.3) เอนไซม์ E2 ส่งผลให้ total VFA สูงกว่า enzyme additive อื่นๆ สัดส่วนของ acetate มีค่าสูงในเอนไซม์ E2, E3 และ E4 กว่า ใน enzyme additives อื่นๆ ในขณะที่สัดส่วนของ butyrate มีค่าสูงในเอนไซม์ E6 และ E8 กว่า enzyme additives อื่นๆ สัดส่วนของ acetate ต่อ propionate มีค่าสูง ในเอนไซม์ E1, E2, E4 และ E7 กว่า ใน enzyme additives อื่นๆ ไม่มีผลของ enzyme doses ต่อ total VFA, molar proportion ของ acetate, propionate และ butyrate (P>0.05) อย่างไรก็ตาม ที่ระดับการเสริมสูงสุด จะลดสัดส่วน acetate ต่อ propionate (P<0.05), สัดส่วน acetate ต่อ propionate ที่ระดับการเสริม 0 µl/g DM หรือ control จะสูงกว่า 4 µl/g DM แต่เท่ากับ 2 µl/g DM สำหรับตัวแปรทั้งหมดที่ทำการศึกษา ได้แก่ total VFA, molar proportion ของ acetate, propionate, butyrate และสัดส่วน acetate ต่อ propionate ไม่มี enzyme × dose interaction (P>0.05)

Table 6.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8)

Enzyme[1]	Dose	24					48				
	(µl/g DM)	Total VFA (m*M*)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (m*M*)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E1	**Mean**	**53.26B**	**60.47C**	**16.35**	**11.56A**	**3.70C**	**66.02AB**	**62.04AB**	**17.51**	**10.57B**	**3.55A**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	57.71	60.94	16.19	11.49	3.76	68.33	62.10	17.53	10.52	3.55
	4	51.03	60.31	16.45	11.54	3.67	68.07	62.07	17.57	10.58	3.54
E2	**Mean**	**51.26B**	**61.41BC**	**16.44**	**11.15AB**	**3.74BC**	**69.31A**	**62.45A**	**17.60**	**10.41B**	**3.55A**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	48.04	62.57	16.25	10.76	*3.85*	73.81	63.19	17.44	10.22	3.62
	4	54.73	61.48	16.65	11.04	*3.70*	71.97	62.22	17.91	10.40	3.48
E3	**Mean**	**53.43B**	**61.54ABC**	**16.45**	**11.17AB**	**3.74BC**	**66.22AB**	**62.34A**	**17.64**	**10.38B**	**3.54AB**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.93	17.44	10.62	3.55
	2	52.51	62.10	16.57	10.92	*3.75*	76.59	63.07	17.99	10.02	3.51
	4	56.79	62.33	16.38	10.93	*3.70*	59.40	62.02	17.49	10.50	3.55
E4	**Mean**	**55.99AB**	**61.58ABC**	**16.30**	**11.22AB**	**3.78ABC**	**63.62ABC**	**62.27A**	**17.39**	**10.40B**	**3.60A**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	56.70	62.32	16.21	10.98	*3.85*	66.03	62.40	17.39	10.28	3.61
	4	60.26	62.42	16.28	11.02	*3.83*	61.42	62.48	17.33	10.30	3.63

[1] Enzyme E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 and E8 are identified in Table 6.1; [2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[A,B,C] Mean within the same column for the main effects of enzyme or substrate having different letters are different at $P < 0.05$. SEM: standard error of the mean.

Table 6.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8) (Cont.)

Enzyme[1]	Dose (µl/g DM)	24					48				
		Total VFA (m*M*)	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA (m*M*)	Molar proportions[2]			Ac:Pr
			Ac	Pr	Bu			Ac	Pr	Bu	
E5	**Mean**	**53.82B**	**61.53ABC**	**16.36**	**11.23AB**	**3.76ABC**	**55.58C**	**61.46ABC**	**17.45**	**10.80AB**	**3.52AB**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	55.71	61.98	16.32	11.11	3.80	53.47	61.00	17.54	10.94	3.48
	4	54.73	62.42	16.35	10.95	3.82	51.93	61.45	17.38	10.84	3.54
E6	**Mean**	**56.97AB**	**62.29AB**	**16.31**	**10.95B**	**3.82AB**	**55.77C**	**61.24BC**	**17.54**	**11.08A**	**3.46BC**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	62.95	63.59	16.25	10.54	3.91	51.23	6120	17.43	11.42	3.43
	4	56.96	63.07	16.26	10.68	3.88	54.14	60.57	17.75	11.21	3.39
E7	**Mean**	**57.49^{AB}**	**62.45^{AB}**	**16.36**	**10.87^{B}**	**3.81^{ABC}**	**59.28^{BC}**	**62.09^{AB}**	**17.52**	**10.46^{B}**	**3.54^{A}**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	63.32	64.17	16.36	10.28	3.92	56.76	61.95	17.42	10.47	3.56
	4	58.86	63.00	16.31	10.69	3.88	59.27	62.38	17.71	10.28	3.53
E8	**Mean**	**61.51^{A}**	**62.87^{A}**	**16.26**	**10.76^{B}**	**3.87^{A}**	**56.87^{C}**	**60.91^{CC}**	**17.53**	**11.13^{A}**	**3.42^{C}**
	0	51.01	60.20	16.41	11.65	3.67	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55
	2	63.10	63.91	16.22	10.40	3.94	51.91	60.25	17.60	11.18	3.40
	4	70.61	64.52	16.14	10.27	3.99	57.20	60.51	17.56	11.64	3.30

[1] Enzyme E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 and E8 are identified in Table 6.1; [2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[A,B,C] Mean within the same column for the main effects of enzyme or substrate having different letters are different at $P < 0.05$. SEM: standard error of the mean.

Table 6.3 Effect of enzyme additive (E) and dose (D) on volatile fatty acid (VFA) concentrations from corn silage after 24 and 48 h of incubation (n = 8) (Cont.)

Enzyme[1]	Dose	24					48				
	(µl/g DM)	Total VFA	Molar proportions[2]			Ac:Pr	Total VFA	Molar proportions[2]			Ac:Pr
		(m*M*)	Ac	Pr	Bu		(m*M*)	Ac	Pr	Bu	
Dose	0	51.01^{B}	60.20^{B}	16.41	11.65^{A}	3.67^{B}	62.16	61.94	17.44	10.62	3.55^{A}
	2	57.32^{A}	62.70^{A}	16.35	10.81^{B}	3.85^{A}	62.26	61.91	17.54	10.63	3.52^{AB}
	4	57.99^{A}	62.42^{A}	16.30	10.89^{B}	3.82^{A}	59.99	61.73	17.58	10.70	3.49^{B}
SEM		3.522	0.786	0.135	0.321	0.032	4.813	0.552	0.163	0.233	0.047
P-value											
Enzyme		0.021	0.011	0.645	0.092	0.039	0.002	0.004	0.695	0.001	0.001
Dose		0.001	0.001	0.237	0.001	0.001	0.584	0.723	0.175	0.715	0.044
Enzyme*Dose		0.199	0.604	0.785	0.906	0.585	0.214	0.341	0.388	0.066	0.074

[1] Enzyme E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 and E8 are identified in Table 6.1; [2]Expressed as individual VFA, mol/100 mol; Ac = acetate, Pr = propionate, and Bu=butyrate.

[A,B,C] Mean within the same column for the main effects of enzyme or substrate having different letters are different at $P < 0.05$. SEM: standard error of the mean.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.4 วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การศึกษาครั้งนี้ทำการประเมินศักยภาพของ fibrolytic enzyme additives ที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า เพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก ผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ต่อการตอบสนองของสัตว์ไม่สามารถคาดการณ์ได้จาก enzyme activity (Beauchemin et al., 2004) ดังนั้นวิธีการ *in vitro* จึงถูกนำมาใช้ในการคัดกรองผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ และระดับการเสริมที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไปใช้ในฟาร์มสัตว์เคี้ยวเอื้อง ทั้งนี้เพราะ *in vitro* method สามารถที่จะคัดกรองตัวอย่างและกลุ่มการทดลองจำนวนมากๆ ได้ การวิเคราะห์แบบ *in vitro* assay จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อที่จะแนะนำชนิดของเอนไซม์ที่จะใช้ในการศึกษาในโครีดนมในอนาคต และระดับ pH ของ buffer ที่ใช้ ปรับให้เท่ากับ 6.5 เพื่อให้สอดคล้องกับระดับ pH ปกติในกระเพาะหมักของโคนมที่ดีรับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก

ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทุกชนิดไม่ส่งผลต่อ TGP เมื่อเปรียบเทียบกับ control ทำนองเดียวกัน Wang et al. (2004) รายงานไม่มีผลต่อ TGP ในช่วงการบ่ม 30 ชม. เมื่อใช้ exogenous enzymes ที่มี endoglucanase, xylanase, และ amylase activities ใน untreated wheat straw นอกจากนี้ Liu and Ørskov (2000) รายงานว่าการเสริม cellulase ระดับต่างๆ ในฟางข้าว (0, 4, 8 to 16 unit per gram straw) ไม่มีผลต่อ GP ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. อย่างไรก็ตาม Yang et al. (2011) รายงานว่า enzyme additives เพิ่ม TGP จาก alfalfa hay หลังการบ่ม 12 ชม. ร่วมกับ ruminal fluid แต่ enzymes ไม่มีผลต่อ TGP จาก rice straw

มีเพียงบางการทดลองเสริมเอนไซม์แล้วเพิ่ม TGP จากฟางข้าวที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. Yang et al. (2011) แนะนำว่าฟางข้าวมีองค์ประกอบของ recalcitrant fiber ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานานกว่าที่ผลของเอนไซม์จะเกิดขึ้น ดังนั้นผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์อาจมีศักยภาพในการใช้ปรับปรุงคุณภาพพืชอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพสูงมากกว่าอาหารหยาบคุณภาพต่ำ

ที่ระยะเวลาบ่มทั้ง 2 เวลา 24 และ 48 ชม. DM degradability ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกกลุ่มการทดลองที่เสริมเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับผลต่อ TGP ฟางข้าวประกอบไปด้วย polysaccharides ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นแหล่งของพลังงานสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก อย่างไรก็ตาม ฟางข้าวมีองค์ประกอบของโปรตีนต่ำ และมีองค์ประกอบของ lignocellulose อยู่สูง Waghorn and McNabb (2003) รายงานว่า esterified bonds ระหว่าง cellulose, hemicellulose และ lignin จำกัดการย่อยได้ของฟางข้าวโดยจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก Eun et al. (2006) รายงานว่า DM degradability ของ untreated rice straw ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. ไม่มีผลกระทบจากการเสริมเอนไซม์บางชนิด (cellulases หรือ xylanases) ในทางตรงกันข้าม Yang et al. (2011) รายงานว่ากลุ่มการทดลองที่เสริมเอนไซม์ทุกกลุ่มการทดลองสามารถเพิ่ม DM degradability ที่ 12 และ 48 ชม. หลังการบ่ม

ADF degradability มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกระดับการเสริมเอนไซม์ ทั้ง 2 ระยะเวลาบ่ม ที่ 24 และ 48 ชม. ยกเว้นเอนไซม์ E4 และ E5 ซึ่งทุกระดับการเสริมให้ผลเหมือนกันกับกลุ่ม control อย่างไรก็ตาม NDF degradability เพิ่มขึ้นเฉพาะที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. Beauchemin et al. (1999) แนะนำว่าการเสริมเอนไซม์ลงบนอาหารโดยตรงส่งผลให้มีการปลดปล่อยเอนไซม์สู่ ruminal fluid ได้ช้า เมื่ออาหารถูกย่อย Yang et al. (2011) รายงานว่า degradability ของ NDF เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มการทดลองที่เสริมเอนไซม์ ทั้ง 2 ระยะเวลาบ่ม (12 และ 48 ชม.) แต่ ADF degradability เพิ่มขึ้นเฉพาะที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. ในทางตรงกันข้าม Eun et al. (2006) รายงานว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ไม่มีผลต่อ NDF และ ADF degradability ของ untreated rice straw ที่ระยะเวลาบ่ม 24 ชม. อย่างไรก็ตาม degradability ของ fibrous fraction NDF และ ADF เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ที่มี protease activity การที่ผลของดารเสริมเอนไซม์ต่อ TGP, DM, NDF และ ADF degradability แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของ rice straw substrate หรือคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่ใช้ Beauchemin et al. (2003) แนะนำว่า enzyme additives มีความผันแปรในด้านประสิทธิภาพ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น enzyme activity, ชนิดและระดับการเสริมเอนไซม์ ชนิดของอาหาร วิธีการเสริมเอนไซม์ และสถานภาพทางสรีรวิทยาของสัตว์

จากการที่ NDFD และ ADFD ของ rice straw หลังการบ่ม 24 และ 48 ชม. ในการศึกษา *in vitro* เพิ่มขึ้น (Fig. 1) NDFD ของเอนไซม์ E1 เพิ่มขึ้นสูงที่สุด คือเพิ่มขึ้นถึง 31% และ 18% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ ในขณะที่ ADFD เพิ่มขึ้นถึง 38% และ 15% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. เช่นเดียวกัน เอนไซม์ E2 สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 26% และ 19% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. และ ADFD เพิ่มขึ้น 21% และ 17% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. เมื่อใช้เอนไซม์ E3 NDFD ของฟางข้าวเพิ่มขึ้น 22% และ 29% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. และ ADFD เพิ่มขึ้น 32% และ 30% หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. การเพิ่ม NDFD โดยเอนไซม์ E4 สูงสุด คือ 13% หลังการบ่ม 24 ชม. และ 11% หลังการบ่ม 48 ชม. และ ADFD เพิ่มขึ้น 6% หลังการบ่ม 24 ชม. และ 8% หลังการบ่ม 48 ชม. สำหรับเอนไซม์ E1, E2, E3 และ E4 ซึ่งเคยใช้ในการศึกษา *in vitro* โดยใช้ corn silage เป็น substrate (บทที่ 4) รายงานผลตอบสนองต่อเอนไซม์ไปในทางบวก ผลการทดลองเดียวกันยังได้รายงานว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ 2 ชนิด คือ E1 (Dyadic) และ E3 (Rovabio) มีประสิทธิภาพมากกว่า E2 (Econase) และ E4 (Cinabio) หลังการบ่มที่ 24 และ 48 ชม. นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ 2 ชนิด คือ E1 และ E2 ยังได้เคยทำการศึกษาในโคนมและให้ผลตอบสนองในทางบวก (Arriola et al., 2011 และ Holtshausen et al.,2011) อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาที่ใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดนี้ร่วมกับฟางข้าว ทั้งในการศึกษา *in vitro* และ *in vivo* ดังนั้นจึงเสนอแนะว่าควรมีการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ E1 และ E3 ในตัวสัตว์ (*in vivo*) โดยใช้อาหารที่มีฟางข้าวเป็นส่วนประกอบต่อไป

สำหรับเอนไซม์ E5 มีผลทำให้ NDFD เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 26% และ 9% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ และ ADFD เพิ่มขึ้น 27% และ 7% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ (Fig.1) เอนไซม์ E6 ทำให้ NDFD เพิ่มขึ้น 13% และ 27% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ และ ADFD เพิ่มขึ้น 21% และ 24% ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 48 ชม. เอนไซม์ E7 ทำให้ NDFD เพิ่มขึ้น 20% และ 20% หลังการบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ และ ADFD เพิ่มขึ้น 23% และ 17% หลังการบ่ม 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ เอนไซม์ E8 ทำให้ NDFD เพิ่มขึ้น 17% หลังการบ่ม 24 ชม. และ 17% หลังการบ่ม 48 ชม. และ ADFD เพิ่มขึ้น 16% หลังการบ่ม 24 ชม. และ 15% หลังการบ่ม 48 ชม. ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ E5, E6, E7 และ E8 นี้ เป็น fibrolytic enzyme additives ที่อยู่ระหว่างการพัฒนา และอยู่ในรูปของของเหลว

Volatile fatty acids เป็นผลผลิตสุดท้ายของการหมักย่อยของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก และเป็นแหล่งพลังงานหลักของสัตว์เคี้ยวเอื้อง การศึกษาครั้งนี้พบว่า fibrolytic enzyme additives สามารถเพิ่มความเข้มข้นของ total VFA, molar proportions ของ acetate และ butyrate ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ DMD, NDFD หรือ ADFD การศึกษา *in vitro* ของ Eun et al. (2006) รายงานว่า ammoniated rice straw (ARS) ให้ผลผลิต total VFA สูงกว่า untreated rice straw (URS) แต่การเสริมเอนไซม์ลงใน URS หรือ ARS ไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิต total VFA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักบางชนิดสามารถสับเปลี่ยนผลผลิตสุดท้ายของการหมักย่อย ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (Russell and Wallace, 1997) อย่างไรก็ตาม Yang et al. (2011) รายงานว่า total VFA ไม่ถูกกระทบจากเอนไซม์ทุกชนิดหลังจากการบ่ม 12 ชม. เมื่อใช้ฟางข้าวร่วมกับ ruminal fluid เป็น substrate แต่ proportion ของ acetate เพิ่มขึ้นเมื่อเสริมเอนไซม์ แต่ความเข้มข้นของ total VFA มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม control หลังการบ่ม 48 ชม. Yang et al. (2011) ยังพบว่าการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรทเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเสริม enzyme additives

6.5 สรุป (Conclusions)

ผลิตภัณฑ์ enzyme additives ที่ทำการประเมินในการศึกษาครั้งนี้มี endoglucanase, exoglucanase and xylanase activities ที่หลากหลาย ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทุกชนิดสามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของฟางข้าว *in vitro* อย่างไรก็ตาม fibrolytic enzyme additive แต่ละชนิดให้ผลตอบสนองแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของการเสริม จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถเสนอแนะได้ว่าควรมีการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ E1 และ E3 ในการศึกษา *in vivo* โดยใช้อาหารที่มีฟางข้าวเป็นส่วนประกอบ

เอกสารอ้างอิง (References)

Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. (1999). Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion in dairy cows. J. Dairy Sci. 82:378-390.

Beauchemin, K. A., D.Colombatto, D. P.Morgavi, and W. Z. Yang. (2003). Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81(E. Suppl. 2), E37-E47.

Beauchemin, K. A., D.Colombatto, and D. P.Morgavi. (2004). A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. Can. J. Anim. Sci. 84, 23-36.

Colombatto, D., and K. A. Beauchemin. (2003). A proposed methodology to standardize thedetermination of enzymic activities present in enzymeadditives used in ruminant diets. Can. J. Anim. Sci. 83, 559-568.

Eun, J.-S., K.A., Beauchemin, S.-H., Hong, and M.W. Bauer. (2006). Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: Effects on *in vitro* fermentation characteristics and degradability. Anim. Feed Sci. Technol. 131, 86-101.

Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph. (1993). Forages cell wall structure and digestibility. American Society for Agronnomics, Wisconsin, USA.

Liu, J.X., and E.R., Ørskov. (2000). Cellulase treatment of untreated and steam pre-treated rice straw effect on *in vitro* fermentation characteristics. Anim. Feed Sci. Technol. 88, 189–200.

Mauricio, R.M., F.L.Mould, M.S.Dhanoa, E.Owen, K.S.Channa, and M.K. Theodorou. (1999) A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Anim. Feed Sci. Technol. 79, 321-330.

Waghorn, G.C., and W.C., McNabb. (2003). Consequence of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. Proc. Nutr. Soc. 62, 383–392.

Wang, Y., B.M., Spratling, D.R., Wiedmeier, and T.A., McAllister. (2004). Effect of alkali pretreatment of wheat straw on the efficacy of exogenous fibrolytic enzymes. J. Anim. Sci. 82, 198–208.

Yang, H. E., 2, Y. S. Son2 and K. A. Beauchemin. (2011). Effects of exogenous Enzymes on ruminal fermentation and degradability of alfalfa hay and rice straw. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24, 56 – 64.

บทที่ 7
ผลของ exogenous fibrolytic enzyme ต่อการย่อยได้ในกระเพาะหมัก ของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับต้นข้าวโพดหมัก
(Effects of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal digestibility in fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage)

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินผลของ 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

This 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.

7.1 บทนำ (Introduction)

การเสริม exogenous fibrolytic enzymes ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย cellulase และ xylanase activities สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใยของต้นข้าวโพดหมักในการศึกษา *in vitro* (Eun and Beauchemin, 2007; Eun et al., 2007) Holtshausen et al. (2011) รายงานการศึกษา *in vitro* พบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์สามารถเพิ่ม หรือมีแนวโน้มเพิ่ม NDF digestibility ของ alfalfa hay, alfalfa silage และ barley silage นอกจากนี้ การศึกษา *in vivo* ยังพบว่าการเสริมเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ive (1.0 ml/kg TMR DM) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำนม และ fat corrected milk yield ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันถึงผลของการเสริมเอนไซม์ในสภาวะของกระเพาะหมัก (*in vivo* study) เลือกผลิตภัณฑ์เอนไซม์ Rovabio Excel LC2 (E1) และส่วนผสม 75:25 ของ Cellulase PLUS และ Xylanase PLUS (E2) จากผลการทดลองที่ได้จากบทที่ 4 นำมาทดลองโดยมุ่งเน้นการศึกษา *in vivo* โดยใช้อาหารที่มี corn silage เป็นอาหารหยาบหมัก เพื่อยืนยันผลการทดลองของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (Chapter 4) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของผลิตภัณฑ์เอนไซม์ 2 ชนิด ต่อ blood glucose, ruminal disappearance และ rumen fermentation ใน fistulated non-lactating dairy cows ที่ได้รับ corn silage เป็นอาหารหยาบ

7.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and methods)

7.2.1 การจัดการสัตว์ทดลองและการให้อาหาร (Animal and feeding managements)

ใช้โคลูกผสม Holstein Friesian ที่ไม่ให้นม เจาะกระเพาะ จำนวน 5 ตัว เลี้ยงขังเดี่ยวในคอก จัดแผนการทดลองแบบ 5 x 5 Latin squares design การทดลองประกอบด้วย 5 ช่วงๆ ละ 21 วัน โดยระยะ 14 วันแรกเป็นระยะปรับตัวให้เข้ากับอาหาร และ 7 วันต่อมาเป็นระยะเก็บตัวอย่าง และการทดลองหาการย่อยสลายในกระเพาะหมัก กลุ่มการทดลองประกอบด้วย 0 (control), 0.5 ml เอนไซม์ E1 /kg of corn silage DM, 1.0 ml เอนไซม์ E1 /kg of corn silage DM, 1.0 ml เอนไซม์ E2 /kg of corn silage DM และ 1.5 ml เอนไซม์ E2 /kg of corn silage DM เจือจางผลิตภัณฑ์ enzyme additives ด้วยน้ำ แล้วใช้ส่วนที่เจือจาง 50 ml ต่อ 1 kg of corn silage DM สเปรย์เอนไซม์เจือจางลงบน corn silage ก่อนให้อาหารในมื้อนั้นๆ สเปรย์น้ำในปริมาตรเท่ากัน (50 ml/1 kg of corn silage DM) ลงบนอาหารในกลุ่ม control ด้วย

7.2.2 การตรวจวัดและการวิเคราะห์ทางเคมี (Measurements and chemical analysis)

โคทดลองได้รับอาหารข้นที่มีโปรตีน 17% วันละ 3 kg แบ่งให้ 2 มื้อ เท่าๆ กัน เวลา 08.00 และ 16.00 น. ร่วมกับต้นข้าวโพดหมักและน้ำสะอาดเต็มที่ ชั่งอาหารก่อนกินและที่เหลือหลังกินและบันทึกน้ำหนักทุกวัน ตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาองค์ประกอบวัตถุแห้ง (48 h at 60°C) ของต้นข้าวโพดหมักของโคแต่ละตัวทุกวัน เพื่อคำนวณการกินได้วัตถุแห้ง (DMI)

บดตัวอย่างอาหารผ่านตะแกรงขนาด 1 mm เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมี วิเคราะห์หา dry matter (DM) ของ corn silage และ concentrate ด้วยการอบ ที่อุณหภูมิ 105 °C 0นกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา crude protein (CP), ether extract (EE), ash (AOAC, 1995), neutral detergent fiber (NDF), detergent fiber acid (ADF), และ acid detergent lignin (ADL) (Van Soest et al., 1991) นำต้นข้าวโพดหมักที่อบแห้งแล้วไปบดผ่านตะแกรงขนาด 2 mm เพื่อนำไปหาการย่อยสลายในตัวสัตว์ โดยชั่งต้นข้าวโพดหมักบดประมาณ 5 กรัม บรรจุลงในถุงไนล่อนขนาด 8 x 11 cm ที่มี pore size 47 μm นำถุงไนล่อนไปจุ่มในกระเพาะหมักของโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะ เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48, และ 72 ชม. เมื่อครบกำหนดในแต่ละเวลา นำถุงไนล่อนออกจากกระเพาะหมัก บรรจุลงในภาชนะที่มีน้ำและน้ำแข็งเพื่อหยุดกระบวนการหมัก หลังจากนั้นล้างถุงภายใต้น้ำไหลอ่อนๆ จนกระทั่งน้ำที่ไหลผ่านใส นำถุงไนล่อนไปอบที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 48 ชม. หลังจากชั่งน้ำหนักถุงไนล่อนแต่ละถุงแล้ว นำต้นข้าวโพดหมักส่วนที่เหลือในถุงไนล่อนไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบของ NDF และ ADF คำนวณหาค่าการสูญหายของ DM, NDF และ ADF และเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของ DM, NDF, และ ADF ก่อนการจุ่มถุงไนล่อนในกระเพาะหมัก

7.2.3 การหมักย่อยในกระเพาะหมัก (Ruminal fermentation)

เพื่อประเมินการหมักย่อยในกระเพาะหมัก ในวันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลอง (d 21) สุ่มเก็บตัวอย่าง rumen fluid จากโคนมเจาะกระเพาะแต่ละตัวที่ระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชม. หลังการ

ให้อาหารเช้า ทำการวัด pH ทันทีเมื่อเก็บตัวอย่าง rumen fluid pH meter สำหรับการวิเคราะห์หา VFAs และ ammonia N บรรจุ rumen fulid ปริมาตร 36 ml ลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 50 ml ที่มี 1M H_2SO_4, อยู่ 4 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1895 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใส (supernatants) บรรจุลงในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 25 ml ปิดจุก นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์ การวิเคราะห์หา acetic, propionic และ butyric acids ใช้เครื่อง GC (Hewlett Packard GC system HP6890, USA, 19091N-113 INNOWAX , Length (meters) 30, I.D. (mm) 0.32 WIDEBORE, Film (um) 0.25) ความเข้มข้นของ ammonia N วิเคราะห์โดยวิธีการ Kjeldahl (AOAC, 1995)

7.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ข้อมูลของการกินได้, ระดับของ pH, ammonia N, VFAs, blood glucose และ ruminal disappearance coefficients ของแต่ละช่วงการทดลองวิเคราะห์โดย ANOVA โดยใช้ Statistical Analysis System (SAS, 1996) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment means โดยใช้ Least Significant Differences

7.3 ผลการทดลอง (Results)

7.3.1 การกินได้ กลูโคสในเลือด และการหมักย่อยในกระเพาะหมัก (Intake blood glucose and ruminal fermentation)

Feed intake, blood glucose, ruminal pH และ ammonia N concentration แสดงไว้ใน Table 7.1 โคทุกกลุ่มได้รับอาหารข้นเท่ากันคือ 2.79 kg DM/d (data not showed), total DM feed intake เท่ากับ 12.43, 12.80, 12.91, 12.75 และ 12.91 kg DM/d ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเสริม fibrolytic enzyme ($P>0.05$) การเสริมเอนไซม์ในอาหารไม่ส่งผลต่อ ruminal pH, ammonia N concentration และ blood glucose ในแต่ละเวลาที่เก็บตัวอย่าง

ความเข้มข้นของ ruminal volatile fatty acid แสดงไว้ใน Table 7.2 ไม่มีผลของ fibrolytic enzyme addition ต่อ total volatile fatty acid concentration, molar proportion of acetate, propionate และ butyrate และสัดส่วนของ acetate: propionate ในแต่ละเวลาที่เก็บตัวอย่าง ($P>0.05$)

Table 7.1 Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on feed intake, ruminal pH, NH_3-N and blood glucose of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage

Item	Control	E1		E2		SEM	P-value
		0.5 ml/kg	1.0 ml/kg	1.0 ml/kg	1.5 ml/kg		
DM Intake (kg/d)	12.43	12.80	12.91	12.75	12.91		0.59
pH							
Hour 0	6.96	6.96	6.94	6.98	7.03		0.77
Hour 2	6.38	6.42	6.36	6.34	6.44		0.54
Hour 4	6.38	6.39	6.33	6.36	6.46		0.46
Hour 6	6.48	6.55	6.57	6.53	6.59		0.71
NH_3-N (mg/l)							
Hour 0	18.66	18.08	19.01	17.73	18.60		0.47
Hour 2	39.77	40.24	39.47	41.74	40.38		0.88
Hour 4	21.47	20.44	21.90	22.15	21.72		0.86
Hour 6	15.91	14.41	14.76	14.65	14.34		0.51
Glucose (mg/dl)							
Hour 0	63.6	63.2	64.8	63.2	63.4		0.80
Hour 2	64.6	60.8	63.6	62.8	62.2		0.36
Hour 4	59.4	60.4	61.0	61.4	60.0		0.77
Hour 6	64.0	64.4	64.6	65.8	65.6		0.25

Table 7.2 Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on volatile fatty acid (VFAs) of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage

Item	Control	E1		E2		SEM	P-value
		0.5 ml/kg	1.0 ml/kg	1.0 ml/kg	1.5 ml/kg		
Acetate (C2)			mol/100mol				
Hour 0	75.66	75.67	75.64	75.75	76.58		0.38
Hour 2	67.59	66.84	67.40	67.27	67.41		0.96
Hour 4	69.35	69.50	69.34	69.15	69.40		0.99
Hour 6	71.05	71.15	71.83	71.15	71.95		0.14
Propionate (C3)			mol/100mol				
Hour 0	15.91	16.25	16.22	16.26	15.75		
Hour 2	22.51	22.41	22.60	21.80	22.34		0.74
Hour 4	19.86	19.74	19.78	20.11	19.84		0.98
Hour 6	18.32	18.12	18.07	18.30	17.89		0.91
Butytate (C4)			mol/100mol				
Hour 0	8.43	8.07	8.14	7.99	7.67		0.69
Hour 2	9.89	10.74	10.00	10.92	10.19		0.37
Hour 4	10.79	10.76	10.93	10.74	10.76		0.99
Hour 6	10.63	10.73	10.09	10.55	10.16		0.39
Totals VFA			mmol				
Hour 0	69.08	71.04	67.81	69.36	68.92		0.60
Hour 2	88.69	92.47	91.36	89.75	88.36		0.72
Hour 4	92.46	95.17	96.47	95.82	94.71		0.67
Hour 6	88.18	94.43	90.76	91.48	92.29		0.47
C2:C3							
Hour 0	4.76	4.68	4.67	4.66	4.88		0.41
Hour 2	3.04	3.01	2.98	3.10	3.04		0.94
Hour 4	3.52	3.54	3.51	3.27	3.33		0.64
Hour 6	3.89	3.94	3.99	3.89	4.06		0.69

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.3.2 การย่อยสลายต้นข้าวโพดหมักในกระเพาะหมัก (Ruminal degradability of corn silage)

In vivo DM, NDF, และ ADF degradability ของต้นข้าวโพดหมักแสดงไว้ใน Table 7.3 ที่ระยะเวลาบ่ม 3, 6 และ 12 ชม. degradability ของ DM ไม่ถูกกระทบโดย enzyme additives อย่างไรก็ตาม การเสริม fibrolytic enzyme เพิ่ม degradability ของ DM หลังจากการบ่มที่ 24, 48 และ 72 ชม. ($P<0.05$) ที่ระยะเวลาบ่ม 24 และ 72 enzyme treatments ทุกกลุ่มเพิ่ม degradability ของ DM เปรียบเทียบกับ control แต่ degradability ของ DM ระหว่างกลุ่ม enzyme ไม่แตกต่างกัน ที่ระยะเวลาบ่ม 48 ชม. การเสริมเอนไซม์ 1.0 ml E1, 1.0 ml E2 และ 1.5 ml E2/kg of corn silage DM สามารถเพิ่ม degradability ของ DM และการเสริมที่ 1.5 ml E2/kg of corn silage DM ให้ degradability ของ DM สูงสุด

ค่าการย่อยสลายของ NDF ไม่ถูกกระทบจากการเสริม enzyme additives ที่ระยะเวลาบ่ม 3, 6 และ 12 ชม. ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม การเสริม fibrolytic enzyme สามารถเพิ่ม degradability ของ NDF หลังการบ่มในกระเพาะหมัก 24, 48 และ 72 ชม. ($P<0.05$) ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 24 ชม. การเสริม 1.0 และ 1.5 ml ของเอนไซม์ E2/kg of corn silage DM เพิ่ม degradability ของ NDF เปรียบเทียบกับ control แต่ degradability ของ NDF ที่เสริม 0.5 และ 1.0 ml ของเอนไซม์ E1 ไม่แตกต่างจากลุ่ม control สำหรับ degradability ของ NDF ที่เสริม 1.5 ml ของเอนไซม์ E2/kg of corn silage DM มากกว่ากลุ่มเสริมเอนไซม์อื่นๆ ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 48 ชม. ในขณะที่ ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 72 ชม. กลุ่มที่เสริมเอนไซม์ทุกกลุ่มสามารถเพิ่ม degradability ของ DM เปรียบเทียบกับกลุ่ม control แต่ degradability ของ DM ระหว่างกลุ่มที่เสริมเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน

ค่าการย่อยสลายของ ADF ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 3 และ 6 ชม. ไม่มีผลกระทบจากการเสริม fibrolytic enzymes ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม degradability ของ ADF เพิ่มขึ้นจากการเสริม enzyme additives ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 12, 24, 48 และ 72 ชม. ($P<0.05$) สำหรับ degradability ของ ADF ที่เสริมเอนไซม์ E2 ปริมาตร 1.5 ml/kg of corn silage DM มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เสริมเอนไซม์อื่นๆ ที่ระยะเวลาบ่มในกระเพาะหมัก 24 และ 48 ชม.

Table 7.3 Effect of exogenous fibrolytic enzyme supplementation on the degradability (%) of dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) of fistulated non-lactating dairy cows fed corn silage

Item	Control	E1		E2		SEM	P-value
		0.5 ml/kg	1.0 ml/kg	1.0 ml/kg	1.5 ml/kg		
DMD							
Hour 3	22.01	22.38	22.70	22.77	22.67		0.26
Hour 6	24.16	26.23	26.14	25.28	26.88		0.12
Hour 12	27.35	29.97	30.86	30.33	30.77		0.11
Hour 24	34.59^{b}	37.67^{a}	37.56^{a}	38.09^{a}	38.43^{a}		0.01
Hour 48	44.53^{c}	47.12^{bc}	48.09^{ab}	49.31^{ab}	50.30^{a}		0.01
Hour 72	50.71^{b}	53.76^{a}	53.44^{a}	54.46^{a}	54.29^{a}		0.01
NDFD							
Hour 3	4.38	3.32	3.68	3.35	3.61		0.34
Hour 6	6.71	7.24	7.33	7.02	7.57		0.62
Hour 12	10.71	12.67	12.97	12.67	13.01		0.24
Hour 24	19.99^{c}	22.09^{bc}	22.24^{bc}	23.83^{ab}	24.68^{a}		0.01
Hour 48	34.70^{c}	36.66^{b}	37.69^{b}	37.87^{b}	39.76^{a}		0.01
Hour 72	41.39^{b}	44.10^{a}	45.04^{a}	44.63^{a}	44.86^{a}		0.03
ADFD							
Hour 3	4.36	3.88	3.97	3.43	3.92		0.27
Hour 6	5.95	5.84	5.97	6.23	6.30		0.74
Hour 12	9.11^{c}	10.69^{b}	11.23^{ab}	12.04^{a}	11.67^{ab}		0.01
Hour 24	16.94^{c}	18.64^{b}	18.88^{b}	19.47^{ab}	20.16^{a}		0.01
Hour 48	29.36^{d}	31.50^{c}	32.36^{bc}	33.61^{ab}	34.34^{a}		0.01
Hour 72	37.65^{c}	38.81^{bc}	39.61^{ab}	40.78^{a}	40.22^{ab}		0.01

$^{a\,b\,c}$ Means within the same row having different letters are different at P<0.05.

7.4 วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การศึกษาครั้งนี้ การเสริม enzyme additive ไม่มีผลกระทบต่อ DMI ทั้งๆ ที่การย่อยได้ DM, NDF และ ADF เพิ่มขึ้น ผลการทดลองเช่นเดียวกัน (Rode et al., 1999; Sutton et al., 2003 และ Chung et al., 2012) รายงานว่า DMI ไม่ถูกกระทบจากการเสริม enzymes นอกจากนี้ Yang et al. (1999) รายงานว่า DMI ไม่ถูกกระทบจากการเสริมเอนไซม์ ทั้งๆ ที่การย่อยได้เยื่อใยตลอดระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อ particulate passage rate อย่างไรก็ตาม การศึกษาบางการศึกษารายงานว่าการเสริมเอนไซม์สามารถเพิ่ม DMI เมื่อเสริมเอนไซม์ลงบนพืชอาหารสัตว์ (Lewis et al., 1999) ในทางตรงกันข้าม Holtshausen et al. (2011) รายงานว่าการเสริมเอนไซม์ในอาหารสามารถลด DMI และการลดลงของ DMI เป็นสัดส่วนกลับกันกับระดับการเสริมเอนไซม์

การเสริมเอนไซม์ลงในอาหารไม่มีผลต่อความเข้มข้นของ total VFA, NH_3, molar proportions ของ individual VFA และ ruminal pH ในขณะที่การย่อยได้เพิ่มขึ้นเมื่อเสริม fibrolytic enzymes ทำนองเดียวกัน Chung et al. (2012) รายงานว่าการเสริม enzyme additives ในอาหารไม่มีผลกระทบต่อความเข้มข้นของ total VFA, NH_3, molar proportions ของ individual VFA และ ruminal pH ในขณะที่ Sutton et al. (2003) รายงาน acetate ลดลง แต่ propionate เพิ่มขึ้น และ butyrate ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับ control นอกจากนี้ Beauchemin et al. (2000) รายงานการเพิ่มขึ้นของ acetate ใน ruminal fluid เมื่อเสริม fibrolytic enzymes

ความเข้มข้นของ blood glucose ระหว่างโคที่กินอาหาร control กับโคที่กินอาหาร control เสริมด้วย enzyme additives ไม่แตกต่างกัน Holtshausen et al., (2011) รายงานว่าการเสริม enzyme additives ลงในอาหารไม่มีผลกระทบต่อความเข้มข้นของ blood glucose อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของ blood insulin เพิ่มขึ้นในโคที่ได้รับอาหาร control เสริมด้วยเอนไซม์ 1.0 ml/kg of TMR DM เมื่อเปรียบเทียบกับโคที่ได้รับอาหาร control ไม่เสริมเอนไซม์

การเสริม fibrolytic enzyme additives ลงในต้นข้าวโพดหมักใน fistulated Crossbred Holstein Friesian non-lactating dairy cows สามารถเพิ่ม DMD, NDFD และ ADFD ในกระเพาะหมักเมื่อเปรียบเทียบกับ control จากผลการทดลอง ทั้งการศึกษา *in vitro* และ *in vivo* สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของต้นข้าวโพดหมัก หลังการบ่มที่ 48 ชม. สำหรับการศึกษา *in vitro* การเสริมเอนไซม์ E1 ที่ 0.5 และ 1.0 ml/kg DM corn silage สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 9% และ 9% ตามลำดับ และสามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 18% และ 21% ตามลำดับ การเสริมเอนไซม์ E2 ที่ 1.0 ml/kg DM corn silage สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 8% และสามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 22% ส่วนการศึกษา *in vivo* การเสริมเอนไซม์ E1 ที่ระดับ 0.5 และ 1.0 ml/kg DM corn silage สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 6% และ 9% ตามลำดับ และสามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 7% และ 10% ตามลำดับ ส่วนการเสริมเอนไซม์ E2 ที่ระดับ 1.0 และ 1.5 ml/kg DM corn silage สามารถเพิ่ม NDFD ได้ถึง 9% และ 15% ตามลำดับ และสามารถเพิ่ม ADFD ได้ถึง 14% และ 17% ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าว

ข้างต้นเหมือนกันกับที่พบในการศึกษา *in vitro* (Chapter 4 และ 5) และ *in vivo* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ามีการใช้ประโยชน์จากโภชนะของต้นข้าวโพดหมักที่เสริม enzyme additive เพิ่มขึ้น Holtshausen et al. (2011) รายงานว่า ในการศึกษา *in vitro* การเสริม developmental enzyme additive (Econase RDE) เพิ่ม หรือมีแนวโน้มเพิ่ม NDFD ของ alfalfa hay, alfalfa silage และ barley silage และในการศึกษา *in vivo* การเสริม nzyme additive ชนิดเดียวกัน (1.0 ml/kg TMR DM) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้ำนม (kg of milk/kg of DMI) ได้ถึง 10.7% และประสิทธิภาพการผลิต FCM (kg of FCM/kg of DMI) ได้ถึง 11.3% จากผลการศึกษา meta analysis ใช้ค่าสังเกต 17 ค่า จาก 7 การศึกษา การเพิ่มขึ้นของ *in vitro* NDFD ของต้นข้าวโพดหมัก 1% unit ส่งผลให้ 3.5% FCM เพิ่มขึ้น 0.14 kg/d และ DMI ของโครีดนมที่ได้รับอาหารที่มีต้นข้าวโพดหมักอยู่สูง (> 40% of the dietary DM) เพิ่มขึ้น 0.12 kg/d (Jung et al., 2004) นอกจากนี้ Oba and Allen (1999) รายงานความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง forage NDFD (in vitro or in situ) และผลผลิตน้ำนม และ DMI เช่นเดียวกัน กล่าวคือ การเพิ่มขึ้นของ NDFD 1% ส่งผลให้ 4% FCM เพิ่มขึ้น 0.25 kg/d และ DMI เพิ่มขึ้น 0.17 kg/d การศึกษาครั้งนี้พยายามหาระดับการเสริม fibrolytic enzyme additive ที่เหมาะสม สำหรับเอนไซม์ E1 ระดับการเสริมที่เหมาะสมคือ 0.5 ml/kg of corn silage DM เอนไซม์ E2 มีระดับการเสริมที่เหมาะสมที่ 1.0 ml/kg of corn silage DM ทั้งนี้เพราะที่ระดับดังกล่าวสามารถเพิ่ม fiber degradability เมื่อเปรียบเทียบกับ control

7.5 สรุป (Conclusions)

การเสริม exogenous fibrolytic enzyme additive ลงในอาหาร fistulated Crossbred Holstein Friesian non-lactating dairy cow ไม่ส่งผลต่อ DMI, ruminal fermentation, rumen pH และความเข้มข้นของ blood glucose อย่างไรก็ตาม การเสริม exogenous fibrolytic enzyme additive สามารถเพิ่ม fiber degradability ของ corn silage จากผลการทดลองที่พบ ควรมีการศึกษาการเสริม enzyme additives ในโครีดนมเพื่อเปรียบเทียบผลผลิตโคนมที่ได้รับอาหารที่มี corn silage ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง (References)

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995.) Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.

Beauchemin, K. A., L. M.Rode, M.Maekawa, D. P.Morgavi, and R.Kampen. (2000). Evaluation of a nonstarchpolysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. J. Dairy Sci. 83, 543–553.

Chung, Y.-H., M. Zhou, L. Holtshausen, T.W. Alexander, T.A. McAllister, L.L. Guan, M. Oba, and K. A. Beauchemin. (2012). A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: ruminal fermentation, rumen microbial populations and enteric methane emissions. J. Dairy Sci. 95, 1419–1427.

Holtshausen, L., Y. H. Chung, H.Gerardo-Cuervo, M. Oba, and K. A.Beauchemin. (2011).Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. J. Dairy Sci. 94, 899–907.

Jung, H. G., M.Raeth-Knight, and J. G.Linn. (2004). Forage fiber digestibility: Measurement, variability, and impact. Proceedings of 65th Minnesota Nutrition Conference. p. 105-125.

Lewis, G. E., W. K.Sanchez, C. W.Hunt, M. A.Guy, G. T. Pritchard, B. I.Swanson, and R. J. Treacher. (1999). Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 611–617.

Oba, M., and M. S. Allen. (1999). Evaluation of the importance of digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 589–596.

Rode, L. M., W. Z.Yang,and K. A.Beauchemin. (1999). Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. J. Dairy Sci. 82, 2121–2126.

Statistical Analysis System. (1996). SAS User' Guide: Statistics. NC: SAS Institute.

Sutton, J. D., R. H.Phipps, D. E.Beever, D. J.Humphries, G. F.Hartnell, J. L.Vicini, and D. L.Hard. (2003). Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-friesian cows. J. Dairy Sci. 86, 546–556.

Van Soest, P.J., J.B.Robertson, and B.A. Lewis. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal production. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.

Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. Rode.(1999). Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82, 391–403.

บทที่ 8
สรุปภาพรวมผลการทดลอง และการนำไปใช้ประโยชน์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เริ่มแรกมีจุดประสงค์ที่จะทดลองหาอัตราส่วนผสมของเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลสและกลุ่มไซแลนเนสที่เหมาะสมกับอาหารหยาบที่นิยมใช้ในประเทศไทย เช่น ฟางข้าวและต้นข้าวโพดหมัก อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดเมืองไทย เพราะ activity ของเอนไซม์ยังไม่เสถียร จะมีจำหน่ายเฉพาะกลุ่มไซแลนเนส และมีเฉพาะ endo - 1-4 beta xylanase เพียงชนิดเดียว จึงมีการศึกษาวิจัยเพียงการทดลองเดียวที่ใช้เอนไซม์ชนิดเดียว (บทที่ 3) การศึกษาวิจัยต่อๆ มาจึงใช้เอนไซม์รวมที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า แต่ได้มีการตรวจสอบวิเคราะห์ activity ของผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทางการค้าทุกชนิดที่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อที่จะได้ทราบ activity ของเอนไซม์แต่ละชนิดในผลิตภัณฑ์นั้นๆ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีการใช้ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ทั้งชนิดเดียว (single enzyme) และชนิดรวมหลายชนิด (mixed enzymes หรือ cocktail enzymes) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า

งานวิจัยแรก ใช้เอนไซม์ชนิดเดียว คือ xylanase (endo-1, 4-beta-xylanase) มี activity 40000 U/g เมื่อเสริมในโคไม่ให้นมเจาะกระเพาะที่ได้รับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบ ไม่ส่งผลต่อการกินได้อาหาร ระดับ pH, NH_3-N และ VFA ในกระเพาะหมัก การเสริม xylanase ไม่มีผลกระทบต่อ DM และ ADF potential disappearance fraction, และ DM และ ADF total disappearance อย่างไรก็ตาม การเสริม xylanase ในระดับสูง สามารถเพิ่ม NDF potential disappearance fraction และ NDF total disappearance จึงควรมีศึกษาถึงส่วนผสมของเอนไซม์หลายชนิด และระดับการเสริมที่เหมาะสม ศึกษาระดับการใช้ที่ต่ำที่สุด ที่สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใย เพื่อลดต้นทุนของการใช้เอนไซม์

งานวิจัยต่อมา (บทที่ 4) ใช้ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ 4 ชนิด (E1, E2, E3 และ E4) ที่มีกิจกรรมของ xylanase, endoglucanase และ exoglucanase ที่แตกต่างกัน (1721 – 1804, 1172 – 1372, 575 – 616 และ 3034 – 3979; 352, 159, 59 และ 360; 13.9, 8.9, 3.3 และ 9.3 unit/ml สำหรับเอนไซม์ E1 – E4 ตามลำดับ) ผลการทดลองพบว่าสารเสริมเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของต้นข้าวโพดหมัก *in vitro* โดยเอนไซม์ E1 และ E2 มีประสิทธิภาพมากกว่า E3 และ E4 เอนไซม์ E1 มีผลตอบสนองสูงสุดที่ระดับการเสริมสูงสุด (8μl/g DM) ส่วนเอนไซม์ E2 การเสริมที่ระดับ 2μl/g DM เพิ่ม fiber disappearance แต่ไม่เพิ่มมากกว่านี้เมื่อระดับการเสริมเพิ่มขึ้น สำหรับเอนไซม์ E3 ระดับการเสริมที่เหมาะสมที่สุดคือ ที่ระดับ 4μl/g DM ส่วนเอนไซม์ E4 ระดับการเสริมที่เหมาะที่สุดคือ 2μl/g DM

งานวิจัยอีกงานหนึ่ง ใช้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ 4 ชนิดเช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้านี้ และใช้ต้นข้าวโพดหมักที่มีคุณภาพแตกต่างกัน 4 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ enzyme additive ทุกชนิด สามารถเพิ่ม DMD, NDFD, ADFD และ TGP ในทุก corn silage อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ E1 และ

E2 มีประสิทธิภาพมากกว่าเอนไซม์ E3 และ E4 ในขณะที่ corn silage1 มีผลทำให้มี DMD, NDFD และ TGP สูงที่สุด ในขณะที่ corn silage 4 มีผลทำให้มี ADFD สูงที่สุด

งานวิจัยเมื่อใช้ฟางข้าวเป็น substrate ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ enzyme additives ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (E1, E2, E3 และ E4) ทุกชนิดสามารถเพิ่ม NDFD และ ADFD ของฟางข้าว *in vitro* อย่างไรก็ตาม fibrolytic enzyme additive แต่ละชนิดให้ผลตอบสนองแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของการเสริม

การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ทำในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบในตัวสัตว์ (*in vivo*) โดยการเสริม exogenous fibrolytic enzyme additives ลงในอาหาร fistulated Crossbred Holstein Friesian non-lactating dairy cow ผลการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ไม่ส่งผลต่อ DMI, ruminal fermentation, rumen pH และความเข้มข้นของ blood glucose อย่างไรก็ตาม การเสริม exogenous fibrolytic enzyme additive สามารถเพิ่ม fiber degradability ของ corn silage

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น ที่ทำทั้งในห้องปฏิบัติและในโคเจาะกระเพาะ และใช้ทั้งฟางข้าวและต้นข้าวโพดหมัก ซึ่งมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในฟาร์มโคเนื้อโคนม การเสริมผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ในทุกการทดลองให้ผลสอดคล้องกัน กล่าวคือ สามารถเพิ่มการย่อยได้เยื่อใย อย่างไรก็ตามระดับของการเสริมผลิตภัณฑ์เอนไซม์แตกต่างกันระหว่างชนิดของผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ นอกจากนี้ระดับของการเสริมเอนไซม์ในการใช้ในตัวสัตว์จะมากกว่าในการทดลองในห้องปฏิบัติการ หากเกษตรกรมาความประสงค์จะใช้ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ ควรคำนึงถึง activity ของเอนไซม์นั้นๆ ประกอบกับราคาของเอนไซม์แต่ละชนิดด้วย เพราะเอนไซม์ที่มี activity สูง ราคาจะสูงตามไปด้วย แต่ระดับการเสริมต่ำ ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ที่มี activity ต่ำ ราคาจะต่ำด้วย แต่ต้องใช้ระดับการเสริมที่สูง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงอาหารหยาบที่ใช้ด้วย สรุปโดยภาพรวมแล้ว ผลิตภัณฑ์สารเสริมเอนไซม์ E1 และ E2 จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์เอนไซม์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ผ่านมากระทำในห้องปฏิบัติการและในโคเจาะกระเพาะ และใช้แหล่งอาหารหยาบคือต้นข้าวโพดหมักและฟางข้าว การศึกษาวิจัยต่อไป ควรมีการศึกษาการใช้สารเสริมเอนไซม์ E1 และ E2 ในโคที่ให้ผลผลิต ทั้งโคเนื้อและโคนม และใช้แหล่งอาหารหยาบที่หลากหลายมากขึ้น เช่น หญ้าสด และหญ้าหมัก นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงวิธีการใช้สารเสริมเอนไซม์ว่าจะใช้อย่างไร เช่น เสริมในอาหารข้น หรือสเปรย์ลงในอาหารหยาบก่อนการให้อาหาร เป็นต้น

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ – สกุล: นาย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ
2. รหัสประจำตัวประชาชน: 3-1911-00164-31-0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน: รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมเลขหมายโทรศัพท์ และ E- mail
   สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ 0-4422-4378
   E- mail: wisitpor@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
ป. ตรี	วท.บ. วิทยาศาสตรบัณฑิต	เกษตรศาสตร์	สัตวบาล	ม.เกษตรศาสตร์	ไทย
ป. โท	M.Agr.Sc. Master of Agricultural Science	Animal Science	Dairy Production	Massey Univ.	NZ
ป. เอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	Animal Science	Dairy Production And Nutrition	Massey Univ.	NZ

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

1. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง
2. โภชนศาสตร์โคนม
3. การจัดการโคนม
4. การจัดการโรงงานอาหารสัตว์ (โคนม)
5. การผลิตพืชอาหารสัตว์
6. A309 Range Management
7. A522 Cattle Feed Industry facilities
8. C307D Range Livestock
9. C307E Intensive Livestock
10. C307F Dairy Products Livestock

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ สถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

a. สถานภาพผู้ร่วมโครงการ :

1. โครงการ “การผลิตอาหารหยาบ อาหารข้น และอาหารผสมสำหรับโคนม” (ผู้ร่วมโครงการ) ระยะเวลา พฤษภาคม 2538 – เมษายน 2541 งบประมาณ 15 ล้านบาท แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2. โครงการ “การผลิตอาหารรวมที่มีคุณภาพและแนวทางการประเมินความต้องการโภชนะโคนมไทย” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา พฤศจิกายน 2542 – ตุลาคม 2544 งบประมาณ 2.0 ล้านบาท แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
3. โครงการ “ผลการเสริมสารโมเนนซินต่อผลผลิตของโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2541 – กันยายน 2543 งบประมาณ 425,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
4. โครงการ “การศึกษากรรมวิธีการผลิตอาหารหยาบหมักจากผลพลอยได้ทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2542 – กันยายน 2544 งบประมาณ 350,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
5. โครงการ “การนำใช้ประโยชน์ต้นอ้อยเป็นอาหารสำหรับโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546 งบประมาณ 749,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
6. โครงการ “การศึกษาผลผลิตของถั่วไมยราและการใช้ถั่วไมยราเป็นอาหารไก่ไข่ (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546 งบประมาณ 436,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
7. โครงการ “การเพิ่ม conjugated linoleic acid ในน้ำนมโคโดยการเสริมน้ำมันพืชในอาหารโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2545 – กันยายน 2547 งบประมาณ 500,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
8. โครงการ “ผลของการเสริม conjugated linoleic acid ในอาหารสัตว์ต่อผลผลิตและคุณภาพเนื้อสุกร เนื้อไก่กระทงและไข่” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2546 – กันยายน 2549 งบประมาณ 700,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)

9. โครงการเพิ่ม conjugated linoleic acid ในน้ำนมโคและผลิตภัณฑ์นม (ผู้อำนวยการโครงการ) แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
10. โครงการเพิ่ม conjugated linoleic acid ในผลิตภัณฑ์สัตว์ (ผู้อำนวยการโครงการ) แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
11. โครงการ “การเพิ่ม conjugated linoleic acid ในเนื้อโคขุนโดยการเสริมน้ำมันพืชในอาหารโคขุน” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2547 – กันยายน 2549 งบประมาณ 900,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
12. โครงการ “การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในกระเพาะหมักโคนมโดยใช้สารสกัดจากก้านและใบมะขามป้อม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2547 – กันยายน 2550 งบประมาณ 1,000,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
13. โครงการ “การใช้ยีสต์จากกระเพาะโคเสริมในอาหารสัตว์ต่อการลดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราในไก่กระทง” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2551 งบประมาณ 1,500,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
14. โครงการ “การศึกษาการเสริมไขมันไหลผ่านชนิดต่างๆ และผลต่อผลผลิตโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2550 งบประมาณ 800,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
15. โครงการ “การศึกษาการเสริมโคลีนและไบโอตินต่อผลผลิตโคนม” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2551 งบประมาณ 500,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
16. โครงการ “การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตแอมโมเนียในกระเพาะหมักของโคและผลต่อผลผลิตโคนม โดยใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชในท้องถิ่น” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2552 งบประมาณ 800,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
17. โครงการ “การใช้ประโยชน์จากเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองเป็นแหล่งพลังงานในอาหารโคนมและสุกรขุน” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2551 – กันยายน 2553 งบประมาณ 500,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
18. โครงการ “การปรับปรุงการใช้ประโยชน์ได้ทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยการเสริมเอนไซม์ เซลลูเลสและไซแลนเนส หรือส่วนผสมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2552 – กันยายน 2555 งบประมาณ 500,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)

19. โครงการ “การเพิ่มโปรตีนในกากมันสำปะหลังและเปลือกมันสำปะหลังโดยใช้จุลินทรีย์” (หัวหน้าโครงการ) ระยะเวลา ตุลาคม 2552 – กันยายน 2554 งบประมาณ 300,000.- บาท แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)

b. งานตีพิมพ์ และงานนำเสนอผลงานประชุมวิชาการ

1. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2541. ผลของการใช้พืชอาหารสัตว์สด และอาหารหยาบผสมอัดก้อนต่อผลผลิตโคนมในช่วงกลางระยะให้นมในฤดูฝน: ฟาร์มมหาวิทยาลัย. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 5(3):179-187.

2. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2542. ผลของการใช้พืชอาหารสัตว์สด และอาหารหยาบผสมอัดก้อนต่อผลผลิตโคนมในช่วงกลางระยะให้นมในฤดูฝน: ฟาร์มเกษตรกร. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 6(2):104-113.

3. Suksombat, W., Holmes, C. W. and Wilson, G. F. 1994. Effects of herbage allowance and a high protein supplement on performance of dairy cows grazing autumn-winter pasture. Proc. NZ. Soc. Anim. Prod. 54:83-86.

4. Suksombat, W. 1995. Growth rate of calves fed different types of calf milk replacer. Suranaree J. Technol. 2(3):157-160.

5. Suksombat, W. 1996. The effect of four different roughage-mixed on dairy cow performances in late lactation. Suranaree J. Technol. 3(3):139-145.

6. Suksombat, W. 1997. Production, growth and nutritive value of 6 forage species grown at Suranaree University of Technology. I. Initial growth. Suranaree J. Technol. 4(1):23-28.

7. Suksombat, W. 1997. Production, growth and nutritive value of 6 forage species grown at Suranaree University of Technology. II. First regrowth. Suranaree J. Technol. 4(2):109-114.

8. Suksombat, W. 1998. The effect of feeding fresh forage and 3 roughage-mixed rations on dairy cow performances in early lactation during rainy season. Suranaree J. Technol. 5(2):80-87.

9. Suksombat, W. 1998. Effect of feeding fresh forage and 3 roughage-mixed rations on dairy cow performances in mid lactation during rainy season. Thai J. Agric. Sci. 31(2):224-234.

10. Suksombat, W. 1999. Effect of feeding fresh forage and 3 roughage-mixed rations on dairy cow performances in early lactation during dry season. Suranaree J. Technol. 5:150-157.

11. Suksombat, W. 2000. Effect of feeding fresh forage and 3 pelleted roughage-mixed rations on dairy cow performances in mid lactation during dry season. Suranaree J. Technol. 7(2):130-136.

12. Suksombat, W. 2000. Performances of lactating cows fed 3 different total mixed rations. In: Proceedings of Quality Control in Animal Production: Nutrition, management, health and products. Chiang Mai University, Thailand.

13. Suksombat, W. 2004. Comparison of different alkali treatment of bagasse and rice straw. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 17(10):1430-1433.

14. Suksombat, W. and Buakeeree, K. 2006. Effect of Cutting Interval and Cutting Height on Yield and Chemical Composition of Hedge Lucerne (Desmanthus virgatus). Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 19(1):31-34.

15. Suksombat, W. and Buakeeree, K. 2006. Utilization of hedge lucerne (Desmanthus virgatus) meal as protein supplement in layer diets. Suranaree J. Technol. 13(2):181-187.

16. Suksombat, W. and Janpanichcharoen, P. 2005. Feeding of sugar cane silage to dairy cattle during the dry season. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 18(8):1125-1129.

17. Suksombat, W. and Karnchanatawee, S. 2005. Effect of various sources and levels of chromium on performances of broilers. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 18(11):1628-1633.

18. Suksombat, W. and Lounglawan, P. 2004. Silage from agricultural by-products for dairy cattle in Thailand: processing and storage. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 17(4):473-478.

19. Suksombat, W., Lounglawan, P., and Noosen, P. 2006. Energy and protein evaluation of five feedstuffs and utilization of cassava pulp as energy source for lactating dairy cows. Suranaree J. Technol. 14(1): 99-107.

20. Suksombat, W. and Mernkrathoke, P. 2005. Feeding of whole sugar cane to dairy cattle during the dry season. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 18(3):345-349.

21. Suksombat, W., and Srangarm, D. 1998. Effect of intraruminal monensin capsule on dairy cow performances in early lactation. Thai J. Agric. Sci. 31(3):402-410

22. Suksombat, W., Jullanand, K., Utaida, N., and Piasangka, S. 2000. Various chemical treatments of bagasse. In: Proceedings of Quality Control in Animal Production: Nutrition, management, health and products. Chiang Mai University, Thailand.

23. Suksomabat, W., Samitayothin, S., and Lounglawan, P. 2006. Effects of Conjugated Linoleic Acid Supplementation in Layer Diet upon Fatty Acid Compositions of Egg Yolk and Layer Performance. Poult. Sci. 85(9):1603-1609.

24. Suksomabat, W., Boonmee, T., and Lounglawan, P. 2007. Effects of Various Levels of Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Performance of Broilers. Poult. Sci. 86: (2):318-324.

25. Suksomabat, W., Lounglawan, P., and Yowa, C. 2008. Effects of conjugated linoleic Acid (CLA) supplementation on performances, carcass quality and fatty acid composition in meat of finishing pigs Suranaree J. Technol. 15(3): 249-260.

26. Lounglawan, P., Suksombat, W., and Chullanandana, K. 2006. The Effect of ruminal bypass fat on milk yield, composition and milk fatty acid of lactating dairy cows. Suranaree J. Technol. 14(1): 109-117.

27. Lounglawan, P., Suksombat, W., and Chullanandana, K. 2006. The Effect of feeding rumen-protected fat on dairy cow performance. Proceedings of the 12th AAAP Animal Science Congress 2006: Challenges of Animal Industry for the Wellbeing of Mankind. 18th-22nd September, BEXCO, Busan, Korea.

28. Suksombat, W., Lounglawan, P., and Noosen, P. 2006. Energy evaluation and utilization of cassava pulp for dairy cows. Proceedings of the 12th AAAP

Animal Science Congress 2006: Challenges of Animal Industry for the Wellbeing of Mankind. 18th-22nd September, BEXCO, Busan, Korea.

29. Kupittayanant, P., Chasombat, J., Suksombat, W., and Kupittayanant, S. 2005. Effects of bypass fat supplementation on the oestrous cycle duration of early lactating cows. P75. Proceedings of AHAT/BSAS International Conference: Integrating Livestock-Crop Systems to Meet the Challenges of Globalization. Rowlinson, P., Wachirapakorn, C., Pakdee, P., and Wanapat, M. Eds. 14th-18th November 2005, Khon Kaen, Thailand.
30. Lounglawan, P., P. Paengkoum, W. Suriyapat and W. Suksombat. 2007. Effect of soybean oil and lactic acid bacteria supplementation on performance and CLA accumulation in milk of dairy cow. In Proc. First International Conference on Sustainable Animal Agriculture in Developing Countries (SAADC2007), Yunnan, China.
31. Lounglawan, P., K. Chullanandana and W. Suksombat. 2008. The effects of soybean oil and rumen protected conjugated linoleic acid on rumen fermentation, fatty acid profiles and CLA content in rumen digesta. In: Proc. 13th AAAP Conference. Hanoi, Vietnam.
32. Suksombat, W., P., Lounglawan and N. Puanpan. 2008. Effects of soybean hulls as a replacement for ground corn on performance of lactating dairy cows. In: Proc. 13th AAAP Conference. Hanoi, Vietnam.
33. Khungaew, M., P. Lounglawan and W. Suksombat. 2009. Silage Production from Cassava Peel as Energy Source. 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries Kuala Lumpur, Malaysia.
34. Suksombat, W. and Chullanadana, K. 2008. Effects of soybean oil or rumen protected conjugated linoleic acid supplementation on accumulation of conjugated linoleic acid in dairy cows' milk. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 21(9): 1271-1277.
35. Suksombat, W. and Chullanadana, K. 2008. Effects of soybean oil or whole cotton seed addition on accumulation of conjugated linoleic acid in beef of fattening Brahman x Thai-Native cattle. Asian-Aust. J. of Anim. Sci. 21(10): 1458-1465.

36. Lounglawan, P., K. Chullanandana and W. Suksombat. 2008. The Effect of Hydrogenated Fat or Ca-Salt of Fatty Acids on Milk Yield, Composition and Milk Fatty Acid of Lactating Dairy Cows. Thai J. Agri. Sci. 41(1-2): 29-36

37. Lounglawan, P, W., Suksombat and N. Puanpan. 2009. Effects of soybean hulls as a replacement for ground corn on performance of lactating dairy cows. Suranaree J. Sci. Technol. 16(2):159-168

38. Wisitiporn Suksombat*, Pipat Lounglawan and Pitakpong Paengsai. 2010. Effects of biotin supplementation on performance of lactating dairy cows. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.

39. Pakorn Klangnork*, Pipat Lounglawan, Mek Khungaew, Pitakpong Paengsai, and Wisitiporn Suksombat. 2010. Effects of amla leaves and branches addition to concentrate on performance of lactating dairy cows. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.

40. Jukkrit Homkhao*, Pipat Lounglawan, Mek Khungaew, Pitakpong Paengsai, and Wisitiporn Suksombat. 2010. Effects of amla leaves and branches supplementation on fermentation and microbial population of lactating dairy cows. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.

41. Atitthan Nanon*, Pakorn Klangnork, Jukkrit Homkhao, and Wisitiporn Suksombat. 2010. The effects of feeding Met hydroxy analog plus MINTREX® Dairy on performance of lactating dairy cows. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.

42. Noppharat Phakachoed, Pipat Lounglawan, Nattanit Puanpan and Wisitiporn Suksombat. 2010. Aflatoxin adsorption ability by yeasts and yeast products. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian

Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.

43. Pipat Lounglawan, Mek khungaew and Wisitiporn Suksombat. 2010. Utilization of cassava peel as energy source of silage. 14th AAAP Animal Science Congress, Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, August 23-27, 2010, Pingtung, Taiwan, ROC.
44. Suksombat, W., P. Lounglawan and P. Paengsai. 2011. Effects of Biotin Supplementation on Milk Production, Milk Composition, Milk Fatty Acids, Ruminal pH, Ammonia Nitrogen and Volatile Fatty Acids in Lactating Dairy Cows. J. Anim. Vet. Adv. 10(16): 2186-2192.
45. Suksombat, . W., A. Nanon, P. Klangnork and J. Homkhao. 2011. Effects of Met hydroxy analog plus MINTREX® Dairy supplementation on performance of lactating dairy cows. J. Anim. Vet. Adv. 10(21):2814-2818.
46. Suksombat, W., R. Mirattanaphrai and P. Paengsai. 2011. Performance of lactating dairy cows in response to supplementation of rumen-protected choline. J. Anim. Vet. Adv. 10(24): 3321-3327.
47. Suksombat, W., C. Meeprom and R. Mirattanaphrai. 2013. Milk Production, Milk Composition, Live Weight Change and Milk Fatty Acid Composition in Lactating Dairy Cows in Response to Whole Linseed Supplementation. Asian-Aust. J. Anim. Sci.
http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13027
48. Phakachoed, N., P. Lounglawan and W. Suksombat. 2012. Effects of xylanase supplementation on ruminal digestibility in fistulated non-lactating dairy cows fed rice straw. Livest. Sci. 149: 104-108.

8. การบริการวิชาการ/ฝึกอบรม/ให้คำปรึกษา

1. ที่ปรึกษาสหกรณ์โคนมวังน้ำเย็น จำกัด (2539 - 2550)
2. ที่ปรึกษาสหกรณ์โคนมพิมาย จำกัด (2542 – 2550)
3. ที่ปรึกษาสหกรณ์โคนมอ่าวน้อย จำกัด (2542 – 2550)
4. ที่ปรึกษาสหกรณ์โคนมมวกเหล็ก จำกัด (2543 – 2545, 2547-2553)
5. ที่ปรึกษาสหกรณ์โคนมสอยดาว จำกัด (2546 - 2550)
6. ที่ปรึกษาสหกรณ์การเกษตรพิมาย จำกัด (2548 - 2550)
7. ที่ปรึกษานิตยสารฟาร์มโคนม สัตว์เศรษฐกิจ (2539 – ปัจจุบัน)

8. ที่ปรึกษาวารสารโคนม อ.ส.ค. (2537 – 2546; 2548 - ปัจจุบัน)
9. ที่ปรึกษานิตยสารวัวควาย (2539 – ปัจจุบัน)
10. ที่ปรึกษาวารสารสยามบราห์มัน (2548-ปัจจุบัน)

9. การเสนอผลงานทางวิชาการ การเขียนบทความทางวิชาการและการเป็นวิทยากร
    1. นำเสนอผลงานทางวิชาการในระดับชาติและนานาชาติ มากกว่า 50 เรื่อง
    2. เขียนบทความทางวิชาการลงตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ มากกว่า 100 เรื่อง
    3. เป็นวิทยากรบรรยายทั่วประเทศมากกว่า 1500 ครั้ง

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ – สกุล: นาย พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์
2. หมายเลขบัตรประชาชน: 3 3014 01335 49 9
3. ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมเลขหมายโทรศัพท์ และ E- mail
   สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
   โทรศัพท์ 0-4422-4160
   E- mail: pipat_l2000@yahoo.com ; pipat@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา/ปี	ประเทศ
ป. ตรี	วท.บ. วิทยาศาสตรบัณฑิต	เทคโนโลยีการผลิตสัตว์	เทคโนโลยีการผลิตสัตว์	ม.เทคโนโลยีสุรนารี, 2541	ไทย
ป. โท	วท.ม. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีการผลิตสัตว์	โภชนศาสตร์สัตว์	ม.เทคโนโลยีสุรนารี, 2544	ไทย
ป. เอก	วท.ด. วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	เทคโนโลยีการผลิตสัตว์	โภชนศาสตร์สัตว์	ม.เทคโนโลยีสุรนารี, 2548	ไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ
   1. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง
   2. โภชนศาสตร์โคนม - โคเนื้อ
   3. การจัดการโคนม - โคเนื้อ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ สถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

   a. หัวหน้าโครงการ:

1. โครงการ “การศึกษาผลของการเสริมน้ำมันถั่วเหลืองและ Rumen-protected CLA (RP-CLA) ในอาหารโคต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบ fatty acids และนิเวศวิทยาใน

กระเพาะหมัก” ระยะเวลา กันยายน 2549 – สิงหาคม 2550 แหล่งทุน สถาบันวิจัยและพัฒนา มทส.

2. การศึกษาการนำเปลือกมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานในการผลิตอาหารหยาบหมักสำหรับโคนมต่อปริมาณน้ำนม องค์ประกอบน้ำนมและคุณภาพน้ำนม ระยะเวลา พฤษภาคม 2551 – เมษายน 2553 แหล่งทุน สกว.
3. โครงการ “การใช้ประโยชน์จากเปลือกมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานในอาหารโคนมต่อปริมาณน้ำนม, องค์ประกอบน้ำนมและคุณภาพน้ำนม” ระยะเวลา ตุลาคม 2551 – กันยายน 2552 แหล่งทุน วช.

b. ผู้ร่วมโครงการ :

1. โครงการ “การเพิ่ม conjugated linoleic acid ในน้ำนมโคโดยการเสริมน้ำมันพืชในอาหารโคนม” ระยะเวลา ตุลาคม 2545 – กันยายน 2547 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
2. โครงการ “ผลของการเสริม conjugated linoleic acid ในอาหารสัตว์ต่อผลผลิตและคุณภาพเนื้อสุกร เนื้อไก่กระทงและไข่” ระยะเวลา ตุลาคม 2546 – กันยายน 2549 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
3. โครงการ “การเพิ่ม conjugated linoleic acid ในเนื้อโคขุนโดยการเสริมน้ำมันพืชในอาหารโคขุน” ระยะเวลา ตุลาคม 2547 – กันยายน 2549 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
4. โครงการ “การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในกระเพาะหมักโคนม โดยใช้สารสกัดจากก้านและใบมะขามป้อม” ระยะเวลา ตุลาคม 2547 – กันยายน 2550 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
5. โครงการ “การใช้ยีสต์จากกระเพาะโคเสริมในอาหารสัตว์ต่อการลดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราในไก่กระทง” ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2551 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)
6. โครงการ “การศึกษาการเสริมไขมันไหลผ่านชนิดต่างๆ และผลต่อผลผลิตโคนม” ระยะเวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2550 แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ (มทส.)

c. งานตีพิมพ์ :

รายชื่อบทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ

พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์, ปราโมทย์ แพงคำ, วรพงษ์ สุริยภัทร และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2548. ผลการเสริมน้ำมันพืชในอาหารต่อการให้ผลผลิต และปริมาณ Conjugated linoleic acid (CLA) ในน้ำนมของโคนม. ในเอกสารการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 5: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์, ปราโมทย์ แพงคำ, วรพงษ์ สุริยภัทร และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2548. ผลการเสริมน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันทานตะวันต่อการให้ผลผลิตของโคนมและปริมาณ Conjugated linoleic acid (CLA) ในน้ำนม. ในเอกสารการประชุมวิชาการ สาขาสัตวบาล/สัตวศาสตร์/สัตวแพทย์ ครั้งที่ 5 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่.

พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์, คู่ขวัญ จุลละนันทน์ และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2549. ผลของการเสริมไขมันไหลผ่านต่อผลผลิตโคนม. ในเอกสารการประชุมวิชาการโคนม 2549. ขอนแก่น: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์, ปราโมทย์ แพงคำ, วรพงษ์ สุริยภัทร และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2549. การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ Conjugated linoleic acid ในน้ำนมโค. ในเอกสารการประชุมวิชาการโคนม 2549. ขอนแก่น: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิพัฒน์ เหลืองลาวัณย์, ปิตุนาถ หนูเสน และ วิศิษฐิพร สุขสมบัติ. 2549. ผลการใช้กากมันสำปะหลังต่อผลผลิตโคนม. ในเอกสารการประชุมวิชาการโคนม 2549. ขอนแก่น: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Lounglawan, P. and W. Suksombat. 2003. Ensiled agricultural by product as Total Mixed Ration for dairy cattle in Thailand. Proceeding of Seminar on SUT Research and Cooperation Between Associations of Higher Education Institutes in Nakhon Ratchasima. 18 Aug 2003. Suranaree University of Technology Thailand. P. 124-125.

Lounglawan, P. and W. Suksombat. 2004. Effect of supplemental of vegetable oil in dairy cattle diet on performances. Research Consortium and Research Network of Higher Education Alliance in Nakhon Ratchasima. 23 Sep 2004. Suranaree University of Technology Thailand. pp.

Lounglawan, P., W. Suksombat and K. Chullanandana. 2006. The Effect of feeding rumen-protected fat on dairy cow performance. In: Proc. 12th AAAP Conference, Busan, Korea.

Suksombat, W., P. Lounglawan and P. Noosen. 2006. Energy evaluation and utilization of cassava pulp for lactating dairy cows. In: Proc. 12th AAAP Conference, Busan, Korea.

Lounglawan, P., P. Paengkoum, W. Suriyapat and W. Suksombat. 2007. Effect of soybean oil and lactic acid bacteria supplementation on performance and CLA accumulation in milk of dairy cow. In Proc. First International Conference on Sustainable Animal Agriculture in Developing Countries (SAADC2007), Yunnan, China.

Lounglawan, P., K. Chullanandana and W. Suksombat. 2008. The effects of soybean oil and rumen protected conjugated linoleic acid on rumen fermentation, fatty acid profiles and CLA content in rumen digesta. In: Proc. 13th AAAP Conference. Hanoi, Vietnam.

Suksombat, W., P., Lounglawan and N. Puanpan. 2008. Effects of soybean hulls as a replacement for ground corn on performance of lactating dairy cows. In: Proc. 13th AAAP Conference. Hanoi, Vietnam.

Khungaew, M., P. Lounglawan and W. Suksombat. 2009. Silage Production from Cassava Peel as Energy Source. 2nd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries Kuala Lumpur, Malaysia.

Phakachoed, N., P. Lounglawan, N. Puanpan, and W. Suksombat. 2010. Aflatoxin Adsorption Ability by Yeasts and Yeast Products. In: Proc. 14th AAAP Conference. Pingtung, Taiwan, the Republic of China.

Klangnork, P., P. Lounglawan, M. Khungaew, P. Paengsai, and W. Suksombat. 2010. Effects of Amla Leaves and Branches Addition to Concentrate on Performance of Lactating Dairy Cows. In: Proc. 14th AAAP Conference. Pingtung, Taiwan, the Republic of China.

Homkhao, J., P. Lounglawan, M. Khungaew, P. Paengsai, and W. Suksombat 2010. Effects of Amla Leaves and Branches Supplementation on Fermentation and Microbial Population of Lactating Dairy Cows. In: Proc. 14th AAAP Conference. Pingtung, Taiwan, the Republic of China.

Suksombat, W., P. Lounglawan, and P. Paengsai. 2010. Effects of Biotin Supplementation on Performance of Lactating Dairy Cows. In: Proc. 14th AAAP Conference. Pingtung, Taiwan, the Republic of China.

Lounglawan, P., M. Khungaew, W. Lounglawan, and W. Suksombat. 2010. Utilization of Cassava Peel as Energy Source of Silage. In: Proc. 14th AAAP Conference. Pingtung, Taiwan, the Republic of China.

รายชื่อบทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

Suksombat, W. and P. Lounglawan. 2004. Silage from agricultural by-products in Thailand: processing and storage. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17(4):473-478.

Lounglawan, P. 2006. The effect of soybean oil or sunflower oil supplementation on dairy cow performance and conjugated linoleic acid (CLA) in milk. Suranaree J. Sci. Technol. 13(3):235-243.

Suksombat, W., S. Samitayotin and P. Lounglawan. 2006. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) supplementation in layer diets on fatty acid compositions of egg yolk and layer performances. Poult. Sci. 85:1603-1609.

Lounglawan, P., W. Suksombat and K. Chullanandana. 2007. The Effect of ruminal bypass fat on milk yields and milk composition of lactating dairy cow. Suranaree J. Sci. Technol 14(1):109-117.

Suksombat, W., P. Lounglawan and P. Noosen. 2007. Energy evaluation and utilization of cassava pulp for lactating dairy cows. Suranaree J. Sci. Technol 14(1):99-107.

Suksombat, W., T. Boonmee and P. Lounglawan. 2007. Effects of Various Levels of Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Fatty Acid Content and Carcass Composition of Broilers. Poult. Sci. 86:318-324.

Suksomabat, W., P. Lounglawan and C. Yowa. 2008. Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Supplementation on Performances, Carcass Quality and Fatty Acid Composition in Meat of Finishing Pigs. Suranaree J. Sci. Technol. 15(3):249-260.

Lounglawan, P., K. Chullanandana and W. Suksombat. 2008. The Effect of Hydrogenated Fat or Ca-Salt of Fatty Acids on Milk Yield, Composition and Milk Fatty Acid of Lactating Dairy Cows. Thai J. Agri. Sci. 41(1-2): 29-36

Lounglawan, P, W., Suksombat and N. Puanpan. 2009. Effects of soybean hulls as a replacement for ground corn on performance of lactating dairy cows. Suranaree J. Sci. Technol. 16(2):159-168

Suksombat, W., P. Lounglawan and P. Paengsai. 2011. Effects of Biotin Supplementation on Milk Production, Milk Composition, Milk Fatty Acids, Ruminal pH, Ammonia Nitrogen and Volatile Fatty Acids in Lactating Dairy Cows. J. Anim. Vet. Adv. 10(16): 2186-2192.