

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ค่าโปรตีนที่ถูกย่อยสลายในกระเพาะรูเมนในห้องปฏิบัติการโดยใช้เอนไซม์
(degradability of feed protein by *in vitro* enzymatic methods)

การวิเคราะห์ค่าโปรตีนที่ถูกย่อยสลายในกระเพาะรูเมนในห้องปฏิบัติการโดยใช้เอนไซม์ (degradability of feed protein by *in vitro* enzymatic methods)

อาหารโปรตีนสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้น บางส่วนสามารถถูกย่อยสลายได้ในกระเพาะรูเมน โดยการทำงานของเอนไซม์ protease ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนได้เป็นเปปไทด์ (peptides) สายสั้น ๆ แอมโมเนีย คาร์บอนโครงสร้าง (C-skeleton) และพลังงาน เราเรียกโปรตีนส่วนนี้ว่า rumen degradable protein (RDP) เป็นประโยชน์ต่อการสร้างโปรตีนของตัวจุลินทรีย์เอง และโปรตีนอีกบางส่วนที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายในกระเพาะรูเมนจะไหลผ่านไปเป็นส่วนของกระเพาะจริง (abomasum) และลำไส้เล็กส่วนต้น มีน้ำย่อย pepsin ที่หลั่งมาจาก gastric glands มาย่อยโปรตีน ให้กลายเป็นกรดอะมิโน และดูดซึมผ่านผนังลำไส้สู่ระบบเลือดต่อไป เราเรียกโปรตีนในส่วนนี้ว่า rumen undegradable protein (RUP) หรือ bypass protein อย่างไรก็ตาม ส่วนของโปรตีนที่เคลื่อนตัวไปถูกย่อยสลายที่ลำไส้เล็กส่วนต้นนั้น มีชื่อรวมเรียกว่า metabolizable protein (MP) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนของ RUP ส่วนของจุลินทรีย์โปรตีน (microbial crude protein, MCP) และส่วนของเนื้อเยื่อภายในที่เกิดการหลุดลอกตัว (Endogenous crude protein, ECP) ดังนั้น การศึกษาถึงค่า RDP และ ค่า RUP จึงมีความสำคัญในด้านการจัดการด้านอาหาร เพื่อให้เกิดสมดุลของ RDP และ RUP และส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิตที่ดีของโคนมตามมา

อุปกรณ์

1. อ่างน้ำ (water-bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิได้หรือ ตู้บ่ม (incubator)
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
3. กระดาษกรอง Whatman No. 541

สารเคมี

1. Borate-phosphate buffer (pH 8.0) (BPB)

สารละลาย BPB เตรียมโดยละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7.6 กรัม และ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 13.17 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2. *Streptomyces griseus* Protease (SGP) (P-5147; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 1 unit represents the quantity of enzyme that will hydrolyse casein to produce color with Folin-Ciocalteu reagent equivalent to 1 μmol tyrosin/min at pH 7.5 and 36°C) contained 5.5 enzyme activity units/mg of solid

สารละลายเอนไซม์ ความเข้มข้น 0.33 units/ml เตรียมโดย ละลายเอนไซม์ จำนวน 6.0 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย BPB จำนวน 100 มิลลิลิตร

3. sodium azide (1%, wt/vol)

สารละลาย sodium azide เตรียมโดย ละลาย sodium azide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ (Coblentz et al., 1999)

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่มีไนโตรเจนประกอบอยู่ 15 มิลลิกรัม (total N) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร (ภาพที่ 1)

เช่น ถั่วคาวาลเคดแห้ง มีโปรตีนหยาบ 14.5 เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง

ดังนั้น ถั่วคาวาลเคดแห้ง มีไนโตรเจน $95.4/6.25 = 2.32$ เปอร์เซ็นต์

ต้องการถั่วคาวาลเคดแห้งที่มีไนโตรเจน 15 มิลลิกรัม ต้องใช้

$$[(15/1000)*100]/2.32 = 0.65 \text{ กรัมของวัตถุแห้ง}$$

และถั่วคาวาลเคดแห้ง มีวัตถุแห้ง 95.4 เปอร์เซ็นต์

เพราะฉะนั้น ต้องใช้ถั่วคาวาลเคดแห้งในการทดลอง

$$(0.65/95.4)*100 = 0.68 \text{ กรัม}$$

2. เติมน้ำละลาย borate-phosphate buffer (BPB) (pH 8.0) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ที่มีตัวอย่าง (ภาพที่ 2) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 39°C (ภาพที่ 3)

3. เติม 1 มิลลิลิตร ของ sodium azide (1%, wt/vol) ใส่ในขวดรูปชมพู่ ซึ่ง sodium azide ทำหน้าที่ป้องกันจุลินทรีย์

4. หลังจากบ่มกับสารละลาย BPB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำละลายน้ำย่อยโปรตีน (protease solution) 10 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 0.33 units/ml (คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายทั้งหมด 0.066 units/ml)

5. หลังการเติมน้ำละลายน้ำย่อยโปรตีนทำการบ่มต่อไปอีก 48 ชั่วโมง (การหยุดกิจกรรมการย่อยโดยวางขวดรูปชมพู่ไว้ในน้ำแข็ง หรือแช่ในตู้เย็น)

6. ทำการกรองสารละลายทันที โดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 541 (ภาพที่ 4) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น (deionised water) จำนวน 400 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 20°C) (ภาพที่ 5)

7. นำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C จนกระทั่งแห้งสนิท

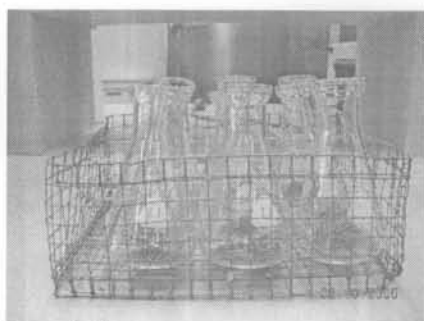
8. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่เหลือ

9. นำตัวอย่างที่เหลือไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ (residue N) โดยวิธี Kjeldahl method (ภาพที่ 6, 7 และ 8)

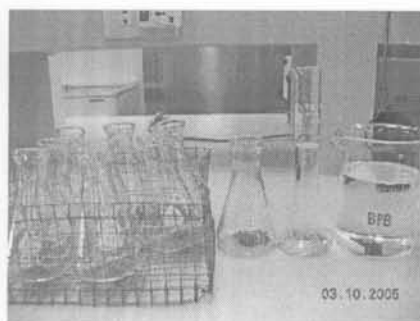
การคำนวณค่า RUP และ RDP

$$\text{RUP (\%)} = (\text{residue N} / \text{total N}) * 100$$

$$\text{RDP (\%)} = 100 - \text{RUP}$$



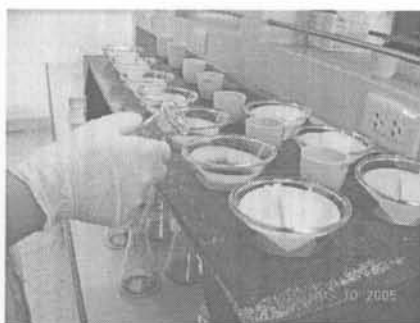
ภาพที่ 1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอาหาร



ภาพที่ 2 เทสาร BPB 40 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3 หลังการเติมสารละลายแล้ว ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 39°C



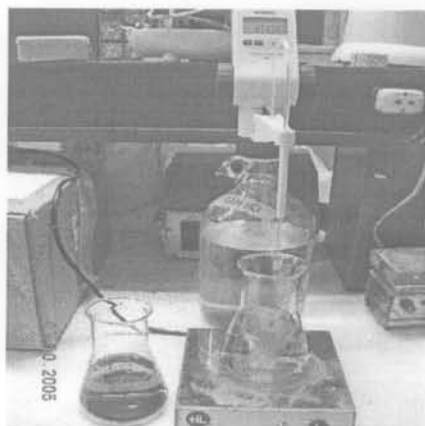
ภาพที่ 4 กรองสารละลาย



ภาพที่ 5 ล้างด้วยน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร



ภาพที่ 6 ภายหลังจากย่อย ทำการกลั่นเพื่อวิเคราะห์หาไนโตรเจน



ภาพที่ 7 ทำการไตเตรทด้วย 0.1N HCl



ภาพที่ 8 การไตเตรทตัวอย่างที่สมบูรณ์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ค่าความหนาแน่น (bulk density, BD) ของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป

การวิเคราะห์ค่าความหนาแน่น (bulk density, BD) ของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป

ในการประกอบสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปมีการใช้วัตถุดิบอยู่หลากหลายชนิด ซึ่งทำให้ลักษณะของอาหารเช่น ขนาดชิ้นอาหาร ความอ่อนนุ่ม ความแข็ง ความหยาบ ความละเอียดของอาหาร เป็นต้น มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสูตร การวิเคราะห์หาค่าความหนาแน่นเป็นวิธีการเบื้องต้นที่สามารถประเมินถึงลักษณะของอาหารได้ โดยในสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ค่าความหนาแน่นที่วัดได้สามารถบ่งบอกถึงความฟาม (bulkiness) ของสูตรอาหารได้

อุปกรณ์

1. ถาดอะลูมิเนียม
2. ช้อน หรือพาย สำหรับตักตัวอย่างอาหาร
3. cylinder ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
4. ถังพลาสติก
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ขึ้นกับลักษณะ และชนิดของอาหาร)

วิธีการ (Khajarern and Khajarern, 1999)

1. สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารแต่ละสูตรทดลองใน 5 วันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง วันละประมาณ 300 กรัม จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่สุ่มทั้งหมดมาผสมกัน แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 9)
2. นำตัวอย่างสูตรอาหารที่บดแล้วมาเทใส่ถาดอะลูมิเนียม และเกลี่ยให้เต็มพื้นที่ถาด (ภาพที่ 10) จากนั้นแบ่งอาหารออกเป็น 4 ส่วน (ภาพที่ 11) แล้วเลือกสุ่มเอา 2 ส่วน แยกออกมาใส่ถาดต่างหาก (ภาพที่ 12)
3. นำอาหารส่วนที่ถูกแบ่งออกมานั้นมาเทใส่ cylinder ขนาด 1,000 มิลลิลิตร (ภาพที่ 13) โดยในระหว่างที่เทอาหารนั้นห้ามกระแทกหรือกระทบอาหารภายใน cylinder เด็ดขาด เมื่อเทอาหารจนถึงขีด 1,000 มิลลิลิตร แล้วใช้ช้อนหรือพายเกลี่ยให้พื้นที่ผิวด้านบนราบเรียบ (ภาพที่ 14) โดยขณะที่เกลี่ยนั้นห้ามกดหรืออัดอาหารภายใน cylinder เด็ดขาด
4. นำอาหารภายใน cylinder 1,000 มิลลิลิตร มาเทใส่ถังพลาสติกที่ชั่งน้ำหนักแล้ว (ภาพที่ 15)
5. นำอาหารในถังพลาสติกไปชั่งน้ำหนัก (ภาพที่ 16)

การคำนวณค่า bulk density

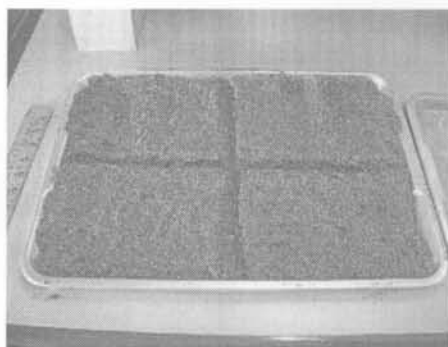
$$\text{bulk density (กรัม/ลิตร)} = \text{น้ำหนักทั้งหมด} - \text{น้ำหนักถังพลาสติก}$$



ภาพที่ 9 ตัวอย่างอาหารที่บดแล้ว



ภาพที่ 10 เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้เต็มพื้นที่
ถาด



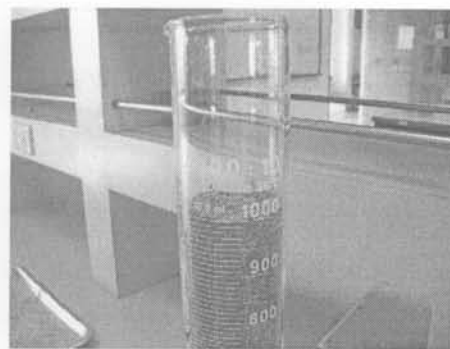
ภาพที่ 11 แบ่งตัวอย่างอาหารออกเป็น 4
ส่วน



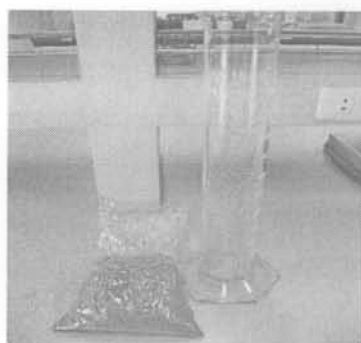
ภาพที่ 12 เลือกสุ่ม 2 ส่วนแยกออกต่างหาก



ภาพที่ 13 เทตัวอย่างอาหารใส่ cylinder
ขนาด 1,000 ml



ภาพที่ 14 เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้พื้นที่ผิว
ด้านบนราบเรียบ



ภาพที่ 15 เทตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก



ภาพที่ 16 ชั่งตัวอย่างอาหาร

ภาคผนวก ค

การศึกษาคุณค่าทางโภชนา และจลนพลศาสตร์การย่อยสลาย ของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป
โดยวิธี *in vitro* gas production technique

การศึกษาคุณค่าทางโภชนา และจลนพลศาสตร์การย่อยสลาย ของสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป โดยวิธี *in vitro* gas production technique

วิธี *In vitro* gas production technique พัฒนามาโดย Menke and Steingass (1988) เป็นการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นระหว่างการบ่ม (incubation) อาหารด้วยของเหลวจากกระเพาะรูเมนในระบบปิด เนื่องจากในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมนจะเกิดแก๊สขึ้น และแก๊สส่วนใหญ่เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และแก๊สเมเทน (CH_4) ปริมาณแก๊สที่วัดได้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยได้ของอาหาร และค่าพลังงานของอาหาร ดังนั้น วิธี *in vitro* gas production technique จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ประเมินคุณภาพอาหารได้

อุปกรณ์

1. ถังบรรจุ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
2. สายนำแก๊ส และอุปกรณ์แยกทางแก๊ส (three way)
3. ขวดวัดขึ้นขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมจุกยางและฝาครอบอะลูมิเนียม
4. กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร (สำหรับถ่ายเทของเหลว)
5. กระบอกฉีดยาแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (สำหรับวัดปริมาณแก๊ส)
6. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ความยาว 1 และ 2.5 นิ้ว (สำหรับถ่ายเทของเหลว และถ่ายเทอากาศ)
7. เข็มฉีดยาเบอร์ 24 ความยาว 1 นิ้ว (สำหรับวัดปริมาณแก๊ส)
8. เครื่องกวนสารให้ความร้อน (hot plate stirrer)
9. ขวดรูปชมพู่ที่มีท่อดูด (suction flask) ขนาด 2 ลิตร พร้อมจุกยางที่มีท่อแยกแก๊ส
10. ตู้อบ (hot air oven)

วิธีการ

1. เตรียมวัตถุดิบอาหารป้อนการทดลอง

นำตัวอย่างทดลอง ที่ผ่านการอบร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นทำการบรรจุตัวอย่างน้ำหนัก 0.2 กรัม ในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมทำการปิดฝาให้สนิทด้วยจุกยาง และครอบแน่นด้วยฝาอะลูมิเนียม (ภาพที่ 17) แล้วทำการบ่มในตู้อบร้อนแห้งที่ 39 องศาเซลเซียส เพื่อบำรุงการย่อยสลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (ภาพที่ 18)

2. เตรียมของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)

โดยการทดลองครั้งนี้ได้เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคนมทดลองที่ได้รับสูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่มีถั่วคาวาลเคดแห้งเป็นแหล่งอาหารหยาบ โดยใช้ stomach tube สอดผ่าน

หลอดอาหารแล้วดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ vacuum pump จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พร้อมต่อกับท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (สร้างสภาพให้คล้ายกับในกระเพาะรูเมนมากที่สุด) เพื่อรอนำมาผสมกับน้ำลายเทียม

3. เตรียมสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen inoculum)

ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ของเหลวในกระเพาะรูเมน และสารละลาย ดังนี้

3.1 สารละลายแร่ธาตุหลัก (macromineral solution)

- 1) Na_2HPO_4 5.7 กรัม
- 2) KH_2PO_4 6.2 กรัม
- 3) MgSO_4 0.6 กรัม
- 4) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลายแร่ธาตุรอง (micromineral solution)

- 1) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.2 กรัม
- 2) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10.0 กรัม
- 3) $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0 กรัม
- 4) $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8.0 กรัม
- 5) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

- 1) NaHCO_3 35 กรัม
- 2) NH_4HCO_3 4 กรัม
- 3) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลาย รีซาซูริน (resazurin aqueous)

- 1) Resazurin 0.1 กรัม
- 2) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

3.5 สารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

- 1) น้ำกลั่น 71.3 มิลลิลิตร
- 2) 1 M NaOH 3.0 มิลลิลิตร
- 3) $\text{Na}_2\text{S}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 504 มิลลิกรัม

3.6 สารละลายน้ำลายเทียม (artificial saliva) 1,500 มิลลิลิตร

- 1) น้ำกลั่น 712.5 มิลลิลิตร
- 2) สารละลายแร่ธาตุหลัก 360.0 มิลลิลิตร
- 3) สารละลายแร่ธาตุรอง 0.12 มิลลิลิตร
- 4) สารละลายบัฟเฟอร์ 360.0 มิลลิลิตร
- 5) รีซาซูริน 1.83 มิลลิลิตร

6) สารละลายไล่ออกซิเจน

4. เตรียมสารละลายน้ำลายเทียม

โดยเติมน้ำกลั่น สารละลายแร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง สารละลายบัฟเฟอร์ และรีซาชูริน ตามสัดส่วนข้างต้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่ต่อกับท่อแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อไล่ออกซิเจน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยใช้ magnetic stirrer กวนอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที (ภาพที่ 20) จากนั้นเติม สารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน อุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู (ภาพที่ 21) แสดงว่าสารละลายดังกล่าว อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นจึงเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนในสัดส่วนของน้ำลายเทียมต่อ ของเหลวจากกระเพาะรูเมนเท่ากับ 2 ต่อ 1 ก็จะได้สารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (ภาพที่ 22)

5. การบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสมและการบ่ม

ทำการบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนใน ขวดที่บรรจุวัตถุดิบอาหารทดลอง ขวดละ 30 มิลลิลิตร (ภาพที่ 23) จากนั้นนำเข้าบ่มที่ตู้บ่มร้อน แห่งที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 24) เพื่อทำการวัดปริมาณแก๊ส

6. การเก็บข้อมูล

6.1 ผลผลิตแก๊ส

ทำการจดบันทึกปริมาตรของแก๊สที่เกิดขึ้น โดยใน 12 ชั่วโมงแรกทำการบันทึก ผลทุก ๆ 1 ชั่วโมง ต่อมานับทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นบันทึกทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 78 และสุดท้ายทำการบันทึกชั่วโมงที่ 96

นำค่าผลผลิตแก๊สที่ได้มาหาค่าคงที่ a, b และ c โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป fit curve เพื่อการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการผลิตแก๊ส ตามโมเดลหรือแบบจำลองสมการของ Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$y = a + b [1 - \text{Exp}^{(-ct)}]$$

เมื่อ y = ผลผลิตแก๊สที่เกิดขึ้น ณ เวลา t

a = จุดตัดแกน y

b = ค่าปริมาณแก๊ส ณ จุดที่เส้นกราฟราบเรียบ (asymptote)

c = ค่าอัตราการผลิตแก๊ส



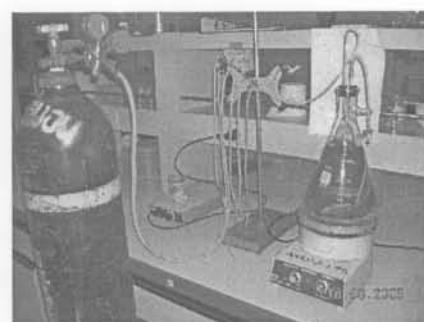
ภาพที่ 17 บรรจุตัวอย่างลงขวดขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝา



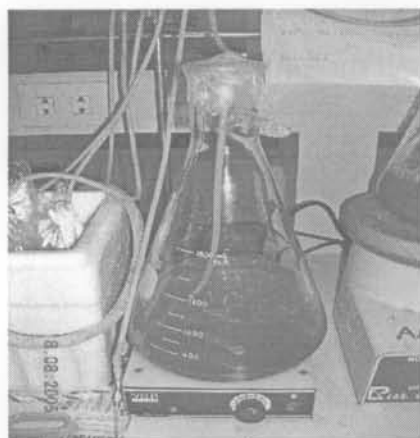
ภาพที่ 18 บ่มในตู้อบร้อนแห้ง 39°C



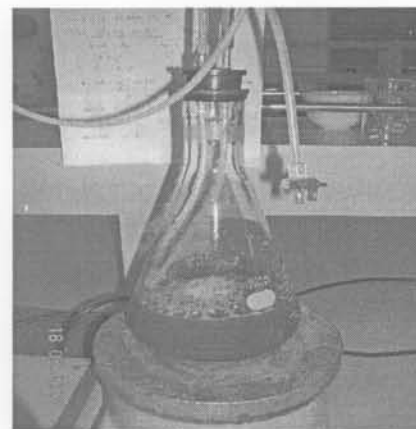
ภาพที่ 19 สารละลายแร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง และบัฟเฟอร์ สามารถเตรียมก่อนได้



ภาพที่ 20 เตรียมสารละลายน้ำลายเทียม



ภาพที่ 21 สารละลายน้ำลายเทียมในสภาวะไร้ออกซิเจน (เป็นสีชมพู)



ภาพที่ 22 ผสมน้ำลายเทียมและของเหลวจากกระเพาะรูเมน (2:1)



ภาพที่ 23 บรรจุสารละลายจากกระเพาะ
รูเมนผสมลงในขวดที่มีวัตถุดิบ
อาหาร



ภาพที่ 24 นำขวดเข้าบ่มที่ตู้บ่มร้อนแห้งที่
39°C เพื่อรวัดแก๊ส

6.2 ความสามารถในการย่อยได้ของวัตถุดิบแห้ง (*in vitro* dry matter digestibility: IVDMD) และอินทรีย์วัตถุ (*in vitro* organic matter digestibility: IVOMD)

หลังการบ่มชั่วโมงที่ 24 และ 48 แต่ละครั้ง ทำการสุ่มขวดย่อยในแต่ละปัจจัย การทดลองออกมาปัจจัยการทดลองละ 2 ขวด นำเข้าแช่เย็นทันที ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ และรอการวิเคราะห์ภายหลัง เมื่อทำการวิเคราะห์ได้นำออกจากตู้ แช่แข็งปล่อยให้ละลาย ทำการกรองเอาของแข็งที่เหลือจากการย่อย นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อนำค่าวัตถุดิบ และค่าที่เหลือจากการย่อยไปทำการคำนวณ ดังสมการ

$$\text{IVDMD (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักวัตถุดิบแห้งเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักวัตถุดิบแห้งที่เหลือหลังการบ่ม}}{\text{น้ำหนักวัตถุดิบแห้งเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{IVOMD (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุที่เหลือหลังการบ่ม}}{\text{น้ำหนักอินทรีย์วัตถุเริ่มต้น}} \times 100$$