

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยคัดแปร โครงสร้างของกากมะพร้าวด้วยวิธีทางฟิสิกส์ ได้แก่ การแช่น้ำ การใช้คลื่นไมโครเวฟ รังสีแกมมา และลำแสงอิเล็กตรอน หลังจากนั้นนำกากมะพร้าวที่ผ่านการคัดแปรมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี (โปรตีน ลิพิด เกลือ เกล็ด และคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพบางประการ ที่มีผลต่อการไฮโดรไลสของเอนไซม์ย่อยอาหาร รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากปลาเศรษฐกิจ 3 ชนิด คือ ปลาตะเพียน ปลานิล และปลาทู เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์น้ำต่อไป

2. ประชากร/กลุ่มตัวอย่าง

2.1 ประชากร

ประชากร คือ กากมะพร้าวที่ได้จากเครื่องคั้นกะทิระบบอัดเกลียวของอุตสาหกรรมผลิตน้ำกะทิ 3 แห่งในอำเภอลำไญ จังหวัดสงขลา

2.2 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างกากมะพร้าวที่ถูกสุ่มเก็บจากเครื่องคั้นกะทิระบบอัดเกลียวของอุตสาหกรรมผลิตน้ำกะทิทั้ง 3 แห่ง โดยสุ่มตัวอย่างมาจากภาชนะบรรจุประมาณร้อยละ 20 และนำตัวอย่างที่เก็บจากทุกจุดมารวมและผสมให้เข้ากัน

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ/อุปกรณ์ ที่สำคัญที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยมีดังต่อไปนี้

- 1) เตาไมโครเวฟ (Microwave Oven) รุ่น MW 71B (Samsung, Malaysia)
- 2) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking Water Bath) รุ่น SW 22 (Julabo, Germany)
- 3) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 5417R (Eppendorf AG, Germany)
- 4) เครื่องทำแห้งภายใต้ความดันและอุณหภูมิต่ำ (Freeze Dryer) รุ่น Delta 2–24 LSC (GmbH, Germany)
- 5) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) รุ่น Quanta 400 (FEI, Czech Republic)
- 6) เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (Differential Scanning Calorimeter: DSC) รุ่น DSC 7 (Perkin Elmer, USA)
- 7) เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตมิเตอร์ (X-Ray Diffractometer: XRD) รุ่น X'Pert MPD (Philips, Netherlands)
- 8) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic Genesys 20 (Thermo Spectronic, USA)
- 9) เครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อ (Micro-Homogenizer) รุ่น THP-220 (OMNI International, USA)
- 10) เตาเผา รุ่น Carbolite ELF 11/14 (Thermal Engineering Services, England)
- 11) เครื่องหาความชื้นอัตโนมัติระบบอินฟราเรด รุ่น MA 30 (Sartorius, Germany)
- 12) หน่วยย่อยรุ่น K-435 (Buchi, Switzerland)
- 13) ชุดกลั่นและไคเตรทรุ่น B-339 (Buchi, Switzerland)
- 14) เครื่องสกัดไขมันรุ่น Soxtherm S306AK (Gerhardt, Germany)

4. วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 การดัดแปรโครงสร้างของกากมะพร้าว

ดัดแปรโครงสร้างของกากมะพร้าวโดยใช้วิธีทางฟิสิกส์ดังนี้

- 1) การแช่น้ำ โดยชั่งน้ำหนักกากมะพร้าว 100 กรัม แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2) การใช้คลื่นไมโครเวฟ โดยนำกากมะพร้าวมาผสมให้เข้ากับน้ำในอัตราส่วน 1:9 (มวล/ปริมาตร) ในปริมาณ 50 กรัม และนำไปไมโครเวฟ โดยนำส่วนผสมดังกล่าวใส่ใน ปีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ ใช้กำลังไฟฟ้า 700 วัตต์ และความถี่ 2,450 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 5 นาที

3) การใช้รังสีแกมมา โดยนำกากมะพร้าวไปฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 60 กิโลเกรย์ (Sunthornchot *et al.*, 2009) แหล่งกำเนิดของรังสีมาจากโคบอลต์-60 เครื่องฉายรังสีเป็น ชนิด Carrier Type Gamma Irradiator (JS 8900 IR-155, MDS Nordion, Canada) ที่ศูนย์ ฉายรังสีอัญมณี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

4) การใช้ลำแสงอิเล็กตรอน โดยนำกากมะพร้าวไปผ่านลำแสงอิเล็กตรอนที่ระดับ 30 กิโลเกรย์ (Shawrang *et al.*, 2011) กระแสอิเล็กตรอนเท่ากับ 10 เมกะอิเล็กตรอนโวลต์ ที่ศูนย์ ฉายรังสีอัญมณี สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

หลังจากนั้น นำกากมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้ง ภายใต้ความดันและอุณหภูมิต่ำ และนำตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจสอบ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ ทางเคมี (4.2) สมบัติทางเคมีกายภาพบางประการ (4.3) และประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (4.4)

4.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าวที่ผ่านการดัดแปร ได้แก่ ปริมาณ โปรตีน ลิพิด เชื้อใย และเถ้า ตามวิธีการของ AOAC (2005) สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ ใช้วิธีคำนวณจากผลต่างของค่าโภชนาการ

4.2.1 การหาปริมาณโปรตีน

1) ขั้นตอนการย่อย ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5–1.0 กรัม ใส่ลงใน หลอดย่อย หลังจากนั้นใส่ตัวเร่งปฏิกิริยาประมาณ 7 กรัม และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 12 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปย่อยในหน่วยย่อย ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส ประมาณ 30–45 นาที จนได้สารละลายสีเขียวใส

2) ขั้นตอนการกลั่น นำสารละลายที่ผ่านการย่อยในข้อ 1) มากลั่นโดยใช้ชุด กลั่นและไต่เตรท โดยกำหนดปริมาตรน้ำ (60 มิลลิลิตร) โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (100 มิลลิลิตร) กรดบอริก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (50 มิลลิลิตร) และกำหนดความ เข้มข้นของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไต่เตรท (0.1 นอร์มัล) ทำการไต่เตรท เมื่อครบเวลาบันทึก ปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้จากเครื่อง

4.2.2 การหาปริมาณลิพิด

อบภาชนะสกัด (Extraction Cup) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ ประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักภาชนะสกัด (W1) และน้ำหนักตัวอย่าง (ประมาณ 2 กรัม) (W2) หลังจากนั้น นำตัวอย่างใส่ลงในทิมเบิล (Thimble) และนำทิมเบิลใส่ลงในภาชนะสกัด และเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 140 มิลลิลิตร นำภาชนะสกัด ใส่ในเครื่องสกัดลิพิด และทำการสกัด โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ประกอบด้วย Boiling Time (30 นาที), Solvent Reduction A (5×15 มิลลิลิตร) และ Extraction Time (80 นาที) หลังจากนั้นเมื่อครบเวลาถอดภาชนะสกัดออก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักภาชนะสกัด พร้อมลิพิด (W3) และคำนวณปริมาณลิพิด (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W3-W1)/W2]$

4.2.3 การหาปริมาณเถ้า

เผาครุชเบิลในเตาเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักครุชเบิล (W1) และน้ำหนักของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ โดยใส่ตัวอย่างลงในครุชเบิลประมาณ 2 กรัม (W2) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปเผาที่ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ นาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักครุชเบิลพร้อมเถ้า (W3) และคำนวณปริมาณเถ้า (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W3-W1)/W2]$

4.2.4 การหาปริมาณเยื่อใย

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการสกัดลิพิด ประมาณ 0.5 กรัม (W1) จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที นำสารแขวนลอยมากรองโดยผ่านเครื่องกรองสุญญากาศ เก็บตะกอนที่ได้ หลังจากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วผ่านกระบวนการเช่นเดียวกับการต้มด้วยกรดซัลฟิวริก แล้วเก็บตะกอนที่ได้ใส่ในภาชนะเดิม อบตะกอนพร้อมครุชเบิลที่อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง ทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ นาน 30 นาที หลังจากนั้น ชั่งน้ำหนักตะกอนพร้อมครุชเบิล (W2) และเผาตะกอนพร้อมครุชเบิลที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในแชลลิกเกอร์ ประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักครุชเบิลพร้อมเถ้า (W3) และคำนวณปริมาณเยื่อใย (ร้อยละ) จาก $100 \times [(W2-W3)/W1]$

4.3 การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพ

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงพีเอช

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตามวิธีการของ Sokhey and Chinnaswamy (1993) โดยชั่งกากมะพร้าวน้ำหนัก 0.5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าพีเอช

4.3.2 สมบัติการละลายน้ำ

ศึกษาสมบัติการละลายน้ำของตัวอย่างตามวิธีการของ Chung *et al.* (2010) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการบดน้ำหนัก 1 กรัม ผสมกับน้ำ 10 มิลลิลิตร เขย่าในอัตราเร็ว 200 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $1,500 \times g$ นาน 10 นาที เก็บส่วนตะกอน ทำให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักของตัวอย่างที่เปลี่ยนไป และคำนวณการละลายน้ำ (ร้อยละ) จาก $100 \times [\text{น้ำหนักตัวอย่างในสารละลายส่วนใส (กรัม)}/\text{น้ำหนักของตัวอย่างทั้งหมด (กรัม)}]$

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกากมะพร้าวในระดับจุลภาคโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรมาบดให้ละเอียด ทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งภายใต้ความดันและอุณหภูมิต่ำ เตรียมตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการติดบนกาวสองหน้าบน Aluminium Stub และเคลือบตัวอย่างด้วยทองและแพลทตินัมในอัตราส่วน 60: 40 ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เท่ากับ 15 กิโลโวลต์

4.3.4 การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์

พิสูจน์เอกลักษณ์ในการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ และปริมาณของผลึก (Crystallinity) ในกากมะพร้าวที่ผ่านการตัดแปรโดยใช้เครื่องเอกซเรย์ดิฟแฟรคโตมิเตอร์ ที่ความต่างศักย์ 40 กิโลโวลต์ กำลังไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ ความเร็วของการสแกน 1 องศาต่อนาที และแสดงผลในรูปของดิฟแฟรคโทแกรมในช่วง 4–35 องศา (2 θ)

4.3.5 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางความร้อน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางความร้อน (Thermal Transition) ของกากมะพร้าวโดยใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ กำหนดสภาวะที่ใช้ในการทดสอบสารตัวอย่างโดยเริ่มต้นอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และสิ้นสุดที่ 400 องศาเซลเซียส โดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราคงที่เท่ากับ 5 องศาเซลเซียส/นาที และทดสอบในสภาวะบรรยากาศเฉื่อยโดยใช้แก๊สไนโตรเจน

4.4 การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

4.4.1 การเก็บตัวอย่างปลา

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาตะเพียน (น้ำหนัก 400–450 กรัม ความยาวเหยียด 29–33 เซนติเมตร) ปลาช่อน (น้ำหนัก 350–400 กรัม ความยาวเหยียด 32–38 เซนติเมตร) และปลานิล (น้ำหนัก 800–900 กรัม ความยาวเหยียด 33–36 เซนติเมตร) อย่างละ 3 ตัว ($n = 3$) จากฟาร์มในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา หลังจากนั้น ทำให้ปลาสลบในน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างลำไส้ และนำตัวอย่างมาสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4.4.2 การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์

นำตัวอย่างลำไส้ของปลาทั้ง 3 ชนิด มาบดด้วยเครื่องปั่นละเอียดเนื้อเยื่อขณะที่แช่ในน้ำแข็งในอัตราส่วน 1:2 (มวล/ปริมาตร) ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl พีเอช 8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $15,000 \times g$ นาน 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างโดยแยกส่วนที่เป็นลิกนินออก เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์สำหรับศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารและประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

4.4.3 การศึกษากิจกรรมของอะไมเลสและทริปซิน

ศึกษากิจกรรมของอะไมเลสตามวิธีการของ Areekijserree *et al.* (2004) โดยเติมน้ำแป้งความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8 ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร และ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร แล้วผสมเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณ 125 ไมโครลิตร แล้วผสมเข้าด้วยกัน จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเติม 1 เปอร์เซ็นต์ กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic Acid) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าด้วยกัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

สำหรับกิจกรรมของทริปซินศึกษาตามวิธีการของ Rungruagsak-Torrissen *et al.* (2006) โดยเติม 1.25 มิลลิโมลาร์ Benzoyl-L-Arginine-p-Nitroanilide ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมเอนไซม์ปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วผสมเข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 30 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรอะนิลิด (*p*-Nitroanilide)

4.4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง

ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของกากมะพร้าวตามวิธีการของ Thongprajukeaw *et al.* (2011) โดยชั่งกากมะพร้าวที่คัดแปรโครงสร้างตัวอย่างละ 5 มิลลิกรัม จากนั้นเติม 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ คลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมเอนไซม์สกัด ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำสารละลายไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นดูดส่วนใส ไปวิเคราะห์เพปไทด์สายสั้นและน้ำตาลมอลโทส

วิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์สายสั้นโดยดูดสารละลายที่ผ่านการย่อยในหลอดทดลอง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กรดพิกริลซัลโฟนิค (Picrylsulphonic Acid) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมเข้ากัน นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยการเติม 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ปล่อยให้เย็นลงที่ อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟ มาตรฐานของดีแอล-อะลานีน (*DL*-Alanine) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโทส โดยนำ สารละลายส่วนใสที่ผ่านการย่อยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโทส

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางสังคมศาสตร์ รายงานผล ข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SEM) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ องค์ประกอบทางเคมี สมบัติทางเคมีกายภาพ และประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง ด้วยการ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างรายคู่ด้วย วิธีค้นแคน (Duncan's Multiple Range Test: DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05