บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

Crude glycerol ซื้อมาจากโรงงานที่ผลิตไบโอดีเซล นอกจากนี้สารเคมีที่ใช้ทั้งหมดเป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 คือ Mineral salt medium (Benincasa, 2004) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้แหล่งคาร์บอนสองแหล่งคือแหล่งคาร์บอนที่ได้จาก Commercial glycerol และ Crude glycerol แหล่งไนโตรเจนได้จากโซเดียมไนเตรต

3.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียและสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Pseudomonas aeruginosa สายพันธุ์ TISTR 781 นำเชื้อที่ได้มาเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียงที่ 4° C โดยก่อนการนำเชื้อมาใช้ต้องทำให้เชื้อปรับสภาพที่อุณหภูมิห้องก่อนและทำ ถ่ายเชื้อทุกๆ 1 เดือน

3.3 สารเคมี

1. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3, Riedel-deHaen, Germany)
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl, Lab-SCAN, Thailand)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, UNIVAR, Australia)
4. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$, LAB-SCAN, Thailand)
5. เอทานอล (C_2H_5OH, เคมีภัณฑ์, Thailand)
6. น้ำมันปาล์ม
7. น้ำมันดีเซล
8. น้ำมันก๊าด
9. เฮกเซน ($CH_3(CH_2)_4CH_3$, AnalaR, England)
10. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$, Meerk kGaA, Germany)
11. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, AnalaR, England)
12. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO, AnalaR, England)
13. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดท ($MgSO_4.7H_2O$, UNOVAR, Australia)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

14. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl, RANKEM, India)
15. ไอรอน (II) ซัลเฟต, เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$. $7H_2O$, UNIVAR, Australia)
16. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$.2 H_2O, Meerk kGaA, Germany)
17. Yeast extrace (HIMEDIA, India)
18. กรดบอริค (H_3BO_3, UNOVAR, Australia)
19. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต เพนทะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$, UNIVAR, Australia)
20. แมงกานีส (II) ซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$, UNIVAR, Australia)
21. แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$.4 H_2O , UNIVAR, Australia)
22. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$, UNOVAR, Australia)

3.4 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้บ่มแบบเขย่า (ยี่ห้อ N-Biotek รุ่น 205 Q)
2. ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (ยี่ห้อ Major Science รุ่น MS-F1-S-5L)
3. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์(ยี่ห้อ Themo รุ่น Genesys 20)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ (ยี่ห้อ SORVALL Biofuge strator รุ่น CE D-37520)
5. เครื่องวัดความเป็นกรดด่างแบบตั้งโต๊ะ (ยี่ห้อ Eutecn instruments รุ่น Cyberb Scan)
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Ohaus รุ่น ARC2140)
7. Autoclave (ยี่ห้อ ALP รุ่น KT 30L)
8. เครื่องวัดแรงตึงผิว (surface tension, Fisher 20)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 ธ.ค. 2554
เลขทะเบียน 242386
เลขเรียกหนังสือ

3.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.5.1 คุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

นำ Crude glycerol ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิบางส่วน จากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ กลีเซอรอล และองค์ประกอบที่ละลายได้ในเฮกเซนซึ่งได้แก่ กรดไขมันและเมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน

3.5.2 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลและไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.2.1 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่างกลีเซอรอลทางการค้า (commercial glycerol) และกลีเซอรอลดิบ (crude glycerol)

เมื่อทำการเลี้ยงโดยใช้ Commercial glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลห้าระดับคือที่ระดับความเข้มข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 8.25, 16.90, 26.08, 32.42, และ 42.45 g/l ทำการเก็บตัวอย่างโดยการวัดค่าความขุ่นเพื่อศึกษากราฟการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 และทำการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4° C และ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ส่วนตัวเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นเหวี่ยงนั้นนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 C^{0} เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

ส่วนในกรณีของการใช้ Crude glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนใช้ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลห้าระดับคือที่ระดับความเข้นข้นกลีเซอรอลเริ่มต้น 9.20, 16.96, 27.26, 35.52, และ 44.78 g/l ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วันโดยทำการ Spread plate นับจำนวนเซลล์เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 และทำการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4° C และ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาส่วนใส มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลที่เหลืออยู่และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์ผลที่ได้โดยเปรียบเทียบระหว่างระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลห้าระดับว่าในระดับใดเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อที่สุดและที่ความเข้มข้นของกลีเซอรอลระดับใดเหมาะสมแก่การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมากที่สุดซึ่งสามาถรวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อโดยช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และใช้ค่าผลได้ (Yield) หรือปริมาณสารลดแรงตึงผิวที่มี

อยู่ในส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในวันสุดท้ายในการหาระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมแก่การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.2.2 ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยเปรียบเทียบระหว่าง Commercial glycerol และ Crude glycerol

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมทั้งของ Commercial glycerol และ Crude glycerol แล้วนำระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมนี้มาศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อ โดยทั้ง Commercial glycerol และ Crude glycerol จะใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ความเข้มข้นของไนเตรตห้าระดับ คือที่ระดับความเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้น 1, 2, 3, 4, และ 5 g/l โดยเก็บตัวอย่างระหว่างการเพาะเลี้ยงทุกวัน ซึ่งกรณีของ Commercial glycerol จะเก็บผลมาวัดค่าความขุ่น หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และปั่นเหวี่ยงเซลล์เพื่อให้ได้ส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตที่เหลือ เพื่อหาปริมาณไนเตรตที่ถูกใช้ไปและหาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตขึ้น ในกรณีของ Crude glycerol ทำการเก็บผลโดย Spread plate นับจำนวนเซลล์และการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง การปั่นเหวี่ยงเซลล์เพื่อให้ได้ supernatant มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตขึ้นเช่นกัน จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 และระดับความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สุดทั้งของ Commercial glycerol และ Crude glycerol

3.5.3 การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เตรียมเชื้อตั้งต้นในขวดเขย่า โดยใช้เชื้อ 5 เปอร์เซนต์ของปริมาณอาหารในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายเชื้อตั้งต้นลงในอาหารเหลว Mineral salt medium ที่มีกลีเซอรอลดิบและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับที่ความเข้มข้นเริ่มต้นระดับต่างๆ ซึ่งบรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำการเพาะเลี้ยงโดยให้อัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ลิตรต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส ทำการควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 6.78-6.82 ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยนำตัวอย่างส่วนแรก 1 มิลิลิตรมาเจือจางแล้วนำสารละลายที่ได้ 0.1 มิลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหารแข็งสูตร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 4° C และ 10,000 rpm เป็นเวลา 10

นาที แล้วทำการเอาเซลล์แบคทีเรียออก จะได้ส่วนใส (supernatant) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4° C เพื่อทำกาวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

3.5.3.1 ผลของความเข้มข้นของกลีเซอรอลต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อและเก็บผลทุกวันซึ่งในการศึกษานี้ใช้กลีเซอรอลดิบเป็นแหล่งคาร์บอนโดยทำการศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นสามระดับคือ 12.99, 36.78, และ 66.70 กรัมต่อลิตร ทำการเก็บผลโดยทำการ Spread plate นับจำนวนเซลล์เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 และทำการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 4° C และ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอา supernatant มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลที่หลงเหลืออยู่และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสามารถวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และใช้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร ($Y_{p/s}$) ในการหาระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.3.2 ผลของความเข้มข้นของไนเตรตต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมของ Crude glycerol แล้วนำระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลเริ่มต้นที่เหมาะสมนี้มาศึกษาผลของความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อไป โดยจะใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของไนเตรตสามระดับในการศึกษานี้คือ 5.58, 11.28, และ 22.03 g/l ซึ่งทำการเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 8 วัน ทำการเก็บผลทุกวันโดย Spread plate นับจำนวนเซลล์และทำการปั่นเหวี่ยงเซลล์เพื่อให้ได้ supernatant มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนเตรตและสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ถูกผลิตขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของไนเตรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.aeruginosa* สายพันธุ์ TISTR 781 และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากที่สุด โดยใช้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (μ) และใช้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร ($Y_{p/s}$) ในการหาระดับความเข้มข้นเข้มข้นของไนเตรตเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.3.2 จลนพลศาสตร์ของการผลิต rhamnolipid

ตัวอย่างน้ำหมัก (Culture broth) ที่เก็บในแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ แล้วอบแห้งเพื่อหาความเข้มข้นของเซลล์ ส่วนใสที่ได้ (supernatant) จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล และ rhamnipid จากข้อมูลที่ได้ในแต่ละการทดลองจะนำมาหาอัตราการเติบโตของเซลล์ อัตราการใช้สับสเทรต อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์รวมทั้งอัตราการผลิต

3.5.4 การผลิต rhamnolipid โดยการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch culture)

ในการเพาะเลี้ยงครั้งคราวนั้นจะใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น (initial volume) 40% ของปริมาตรทำงานสูงสุด (maximum working volume) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้อาหารเริ่มต้น 1.6 L โดยวิธีการเติมอาหารเป็นการเติมอาหารเป็นระยะๆ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงจนกลีเซอรอลถูกใช้จนเกือบหมดแล้วจึงเติมอาหารเข้าไปใหม่ลงไปอีกครั้ง โดยในการเติมแต่ละครั้งกำหนดให้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพไม่เกิน 3 % w/v ทำการเติมอาหารซ้ำไปเรื่อย จนถึงทำงานสูงสุดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเก็บตัวอย่างมาเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเซลล์ กลีเซอรอล และ rhamnolipid

3.5.5 การทดสอบคุณสมบัติของ rhamnolipid

Rhamnolipid ที่ผลิตได้จาก crude glycerol จะถูกนำมาสกัดและเตรียมเป็นสารละลายเพื่อทดสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ equilibrium surface tension, interfacial tension, critical micelle concentration (CMC) และ emulsification index (E_{24})

3.5.5.1 การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของ rhamnolipid

นำน้ำหมักจากขั้นตอนการผลิต มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก นำส่วนใสที่ได้ (supernatant) มาปรับ pH ให้เป็น 2 โดยใช้ HCl ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ทำให้ได้ acidified supernatant ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ตกตะกอน ทำการแยกตะกอนที่ได้โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลาย sodium bicarbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ทำการสกัดแยกสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์ ด้วยการเติมคลอโรฟอร์มต่อเอทานอลในอัตราส่วน 2:1 ที่อุณหภูมิห้องโดยใช้ supernatant 1 ส่วนผสมกับสารสกัด 1ส่วน เขย่าให้เข้ากันในกรวยแยกเป็นเวลา 5 นาที แยกเก็บส่วนที่เป็นสารสกัดที่อยู่ด้านล่างไว้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ซึ่งสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะละลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลาย (กฤษฎา บุญชัย, 2552) จากนั้นทำการสกัด supernatant ซ้ำอีกครั้ง และแยกเก็บส่วนที่เป็นตัวสกัดรวมกันไว้ (ปริญญา ไกรวุฒินันท์, 2551) จากนั้นนำมาระเหยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดตัวทำละลายออก จะได้ผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีลักษณะเหนียวหนืดคล้ายสีน้ำผึ้ง 5.20 กรัมต่อน้ำหนัก 1 ลิตร

3.5.5.2 การวัดแรงตึงผิวของ rhamnolipid

เทสารละลายแรมโนลิปิดที่ได้จากการสกัดที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1-2000 mg/l ลงในบีกเกอร์แล้ววางบนที่วางตัวอย่างภายในเครื่องวัดแรงตึงผิว (surface tension, Fisher 20) ค่อยๆ เลื่อนที่วางตัวอย่างจนกระทั่งวงแหวนอยู่ในผิวหน้าของตัวอย่างพอดี ในขณะเดียวกันปรับปุ่มที่อยู่ทางขวาของเครื่องวัดแรงตึงผิวเพื่อที่จะให้ index อยู่บนเส้นเดียวกันกับตำแหน่งอ้างอิงบนกระจก ให้ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆ จนกว่าฟิล์มของตัวอย่างจะแตกขาด ซึ่งค่าที่อ่านได้บนสเกลในตอนที่ฟิล์มขาดพอดี คือแรงตึงผิว ทำการวัดค่าแรงตึงผิวอย่างน้อย 3 ครั้ง จนกว่าค่าที่ได้จะใกล้เคียงกัน หาค่าเฉลี่ย critical micelle concentration (CMC)

3.5.5.3 การวัด Emulsification index (E_{24})

นำแรมโนลิปิดปริมาตร 5 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำมันลงไปปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการศึกษาความสามารถในการเกิดอิมัลชั่นในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำมันปาล์ม,น้ำมันดีเซล, น้ำมันก๊าด (Kerosene), เฮกเซน วัดส่วนที่เกิดอิมัลชั่นและคำนวณหา emulsification index (E_{24})

3.5.6 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของ rhamnolipid

3.5.6.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแรมโนลิปิด

นำแรมโนลิปิดปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง จากนั้นนำมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 80,90,100,110 และ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที ให้ที่อุณหภูมิห้องเป็นตัวควบคุม ทำการวัด emulsification index (E_{24})

3.5.6.2 ผลของพีเอชต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด

นำแรมโนลิปิดมาปรับพีเอชให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ในการปรับพีเอช จากนั้นนำแรมโนลิปิดที่ผ่านการปรับพีเอชแล้วมาทำการวัด emulsification index (E_{24})

3.5.6.3 ผลของความเข้มข้นของเกลือต่อประสิทธิภาพของแรมโนลิปิด

ทำการเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 0 % (control), 2%, 4%, 6%, 8% และ 10% ลงในแรมโนลิปิด ละลายให้เข้ากันทำการวัด emulsification index (E_{24})