ว.วิทย. มข. 44(1) 1-21 (2559) KKU Sci. J. 44(1) 1-21 (2016)

การฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์: ความท้าทายของกระบวนการเพื่อยกระดับคุณภาพไหมไทย

Enzymatic Silk Degumming: The Challenged Process for Upgrading Quality of Thai Silk

เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีโปรตีนและเอนไซม์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

Email: pramvadee.yuv@mahidol.ac.th, scpyvw@gmail.com

บทคัดย่อ

ผ้าไหมไทยมีเอกลักษณ์เฉพาะที่ผิวสัมผัสและความมันวาว และเป็นงานหัตถกรรมที่มีลวดลายสวยงาม การพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไหมไทยสามารถทำได้ในขั้นตอนการฟอกกาวไหม โดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนกาวไหม ซึ่งทำให้การฟอกกาวไหมมีจุดยุติอย่างแท้จริง และการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าวิธีการดั้งเดิม ทำให้สามารถฟอกกาวไหมได้อย่างสม่ำเสมอและลดความเสี่ยงที่โปรตีนเส้นใยไหมจะถูกทำลายลงได้ ดังนั้นจึงได้เส้นไหมที่มีคุณภาพดีขึ้น และยังลดปัญหาความไม่สม่ำเสมอของกาวไหมบนเส้นไหมที่รวบรวมมาจากหลายแหล่งได้ การฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์มีส่วนช่วยสร้างค่านิยมในการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมให้กับผู้ผลิตและผู้ใช้ได้ โดยลดการใช้สารเคมี พลังงาน และน้ำ (Reduce) จึงลดการสร้างมลภาวะ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเอนไซม์ออกจากน้ำทิ้งฟอกกาวไหมแล้วนำกลับมาใช้ได้ใหม่ (Reuse) อีกทั้งแยกกาวไหมไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ได้ (Recovery) และนำน้ำที่ใช้แล้วกลับมาใช้รดน้ำต้นไม้ได้ด้วย (Recycle) จึงลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและเพิ่มมูลค่าให้กับการฟอกกาวไหมทั้งกระบวนการ ซึ่งคาดว่าจะมีมูลค่าเกินกว่ามูลค่าของเอนไซม์ที่นำมาใช้ และเกิดเป็นวัฏจักรที่อยู่ได้อย่างยั่งยืนต่อไป สิ่งเหล่านี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการบริหารจัดการอย่างเป็นระบบตั้งแต่การผลิตเอนไซม์ การถ่ายทอดความรู้แก่ผู้ใช้เอนไซม์ เทคโนโลยีการรวบรวมกาวไหม และการนำกาวไหมที่ได้มาทำเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ตลอดจนการส่งเสริมการตลาดของผ้าไหมและผลิตภัณฑ์ใหม่เป็นต้น

ABSTRACT

Signature of Thai silk is found in its texture, special luster, and being a handcraft with distinctive color patterns and weaving designs. A possible way to efficiently improve the overall production of Thai silk is to replace the usage of chemicals with a sericin-specific protease in a silk-degumming process. The enzyme can specifically hydrolyze sericin without damaging fibroin with an absolutely defined endpoint under a lower temperature than that used in traditional methods; thus providing a better control of the process as well as higher quality and uniformity of degummed silk. The use of enzymatic degumming could diminish the problems in subsequent dyeing and weaving steps due to unequal quality of sericin in raw silk supplied by different producers. In addition, it promotes public understanding and core values of green technology - the chemical usage as well as energy and water consumption are **reduced**, therefore lowering the amount of wastes; the enzyme is possibly **reused** in another batch of degumming process; and water can be **recycled** for other purposes. Moreover, sericin may be **recovered** to make new products and generate additional incomes, which should surpass the cost of the enzyme. However, it is sustainable only if a good administrative system and management of sericin application are implemented, which include enzyme production, technology transfer, logistic on collecting of sericin, new production lines, and marketing strategies for Thai silk and the new products.

คำสำคัญ: การฟอกกาวไหม, โปรตีนกาวไหม, โปรตีนเส้นใยไหม, เทคโนโลยีสะอาด, โปรติเอส, เอนไซม์

Keyword: Silk degumming, Sericin, Fibroin, Green technology, Protease, Enzyme

บทนำ

ผ้าไหมไทยเป็นงานหัตถกรรมที่เกิดจากภูมิปัญญาพื้นบ้านและสืบทอดต่อกันมา มีเอกลักษณ์เฉพาะทั้งความสวยงามและการให้คุณค่าทางจิตใจ ด้วยการใช้วัตถุดิบที่เป็นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านและการใช้กรรมวิธีการผลิตด้วยมือทุกขั้นตอน ทำให้ผ้าไหมไทยมีความมันวาว และมีลักษณะสวยงามแปลกตาเป็นพิเศษจากเส้นไหมที่เป็นปุ่มปม ลวดลายจากการย้อม และการทอเป็นผืนผ้าไหม (รสสุคนธ์และชาญชัย, 2556)

ผ้าไหมไทยเป็นที่รู้จักและเป็นที่ต้องการมากในตลาดต่างประเทศ จึงต้องมีการกำหนดเครื่องหมายรับรอง “ตรานกยูงพระราชทาน” เพื่อแสดงคุณสมบัติของวัตถุดิบและกรรมวิธีการผลิตที่เป็นมาตรฐานของผ้าไหมไทย และบ่งบอกว่าทุกชิ้นถูกผลิตในประเทศไทยเท่านั้น เพื่อเป็นการป้องกันและแก้ไขปัญหาการแอบอ้างคำว่า “ไหมไทย” ไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้า

เกณฑ์ขั้นสูงสุดของเครื่องหมายรับรอง ซึ่งถือว่าเป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาพื้นบ้านดั้งเดิมของไทยอย่างแท้จริง คือ **นกยูงสีทอง** (Royal Thai Silk) ที่ต้องใช้เส้นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านเป็นทั้งเส้นพุ่งและเส้นยืนในการทอผ้าไหม โดยเส้นไหมที่ใช้ต้องสาวด้วยมือผ่านพวงสาวลงภาชนะ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่ทำให้เส้นไหมกลมฟูไม่ลีบแบน และทอด้วยกี่ทอมือแบบพื้นบ้านชนิดพุ่งกระสวยด้วยมือ และย้อมด้วยสีธรรมชาติ หรือสีเคมีที่ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม รองลงมาคือ **นกยูงสีเงิน** (Classic Thai Silk) ซึ่งถือว่าเป็นการอนุรักษ์ภูมิปัญญาพื้นบ้านในบางขั้นตอน

โดยใช้เส้นไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านหรือพันธุ์ไทยปรับปรุงเป็นเส้นพุ่งและ/หรือเส้นยืน และเส้นไหมที่ใช้อาจสาวด้วยมือหรือด้วยอุปกรณ์ที่ใช้มอเตอร์ขับเคลื่อนไม่เกิน 5 แรงม้า และทอด้วยกี่ทอมือแบบกี่กระตุกได้ ส่วน **นกยูงสีน้ำเงิน** (Thai Silk) และ**นกยูงสีเขียว** (Thai Silk Blend) จะเน้นเฉพาะวัตถุดิบที่นำมาทอเป็นผ้า คือเป็นเส้นไหมแท้หรือเป็นเส้นไหมที่มีเส้นใยอื่นผสมได้ ตามลำดับ (กรมหม่อนไหม, 2554)

ในสภาวะที่มีการแข่งขันทางการตลาดสูงในปัจจุบันทำให้จำเป็นต้องมองเอกลักษณ์และคุณภาพของผ้าไหมไทยควบคู่ไปกับประสิทธิภาพในการผลิต โดยพัฒนารูปแบบการผลิต จากเดิมที่ขึ้นอยู่กับวิถีการดำเนินชีวิตของเกษตรกรยามว่างจากฤดูกาลเพาะปลูกหรือเก็บเกี่ยวให้เป็นระบบและมีมาตรฐานด้วยการบริหารจัดการในลักษณะของกลุ่มผู้ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตผ้าไหม 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ผลิตต้นน้ำ (ปลูกหม่อน เลี้ยงไหม และสาวไหมด้วยมือ) กลางน้ำ (สาวไหมอุตสาหกรรม การฟอกย้อมสี และทอผ้า) และปลายน้ำ (ผลิตภัณฑ์และการตลาด)

กรมหม่อนไหม (สถาบันวิจัยหม่อนไหม เดิม) ได้ดำเนินการพัฒนาอุตสาหกรรมไหมไทยอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเน้นกลุ่มผู้ผลิตต้นน้ำ โดยรวบรวมและปรับปรุงพันธุ์หม่อนและไหม จัดทำคู่มือและมาตรฐานในการปลูกหม่อน การเลี้ยงไหม และการสาวไหม ตลอดจนคิดค้นเครื่องสาวไหม รวบรวมวิธีย้อมสีและพันธุ์ไม้ที่ใช้ในการย้อมสี รวมทั้งจัดการอบรมเกษตรกร และได้ขยายการดำเนินการไปถึงปลายน้ำด้วยการจัดทำยุทธศาสตร์กรมหม่อนไหม พ.ศ. 2554-2557 ที่ครอบคลุมด้านการสร้างความเข้มแข็งให้กับเกษตรกรและองค์กรภาคเกษตร การพัฒนาการผลิตและสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับสินค้า การพัฒนาด้านการตลาดและประชาสัมพันธ์ การวิจัยและพัฒนา และการเพิ่มประสิทธิภาพการบริหารจัดการองค์กร ทั้งนี้เพื่อลดปัญหาการสูญเสียที่เกิดจากเกษตรกรรายย่อยเลี้ยงไหมต่างพันธุ์กัน ใช้วิธีการสาวและทักษะที่แตกต่างกันแล้วมีผลทำให้เส้นไหมที่ได้มีความแตกต่างกันทั้งขนาด คุณภาพ เกรด และสี ตลอดจนการผลิตที่ไม่ตรงตามความต้องการของตลาด และการขาดขั้นตอนการรวบรวมและคัดแยกประเภทเส้นไหมก่อนจำหน่ายให้โรงงาน อีกทั้งเพื่อให้สามารถเปิดตลาดใหม่ๆ ได้เพิ่มขึ้น

เนื่องจากกระบวนการผลิตต้นน้ำส่งผลถึงกระบวนการผลิตกลางน้ำ คือทั้งชนิด ขนาด และคุณภาพของเส้นไหมมีผลต่อการฟอกย้อมเส้นไหม และในทางปฏิบัติการฟอกกาวไหมขึ้นอยู่กับความชำนาญของบุคคลและยากต่อการควบคุมคุณภาพ ที่สำคัญการขาดความสม่ำเสมอในการฟอกกาวยังส่งผลไปถึงการย้อมสีได้ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นผู้เขียนจึงขอเสนอการพัฒนาเทคโนโลยีในการฟอกกาวไหม โดยการนำเอนไซม์ที่จำเพาะต่อกระบวนการมาใช้เพื่อช่วยในการปรับปรุงคุณภาพไหมไทยและปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตให้ดีขึ้น อีกทั้งเพื่อสร้างจุดขายให้กับไหมไทยในเชิงอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมด้วย

พันธุ์ไหมไทย

ไหมไทยเป็นไหมชนิดที่เลี้ยงด้วยใบหม่อน (Mulberry) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* มีวงจรชีวิตแบบสมบูรณ์ (Complete metamorphosis) เป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้อยู่ภายในรังไหม และระยะผีเสื้อ ตามมาตรฐานสินค้าเกษตร พันธุ์ไหมไทยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (มกษ. 8001-2553) ได้แก่

ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน คือ ไหมที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย รวมทั้งไหมพันธุ์ไทยที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นจากไหมพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยเท่านั้น ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านนี้เป็นไหมที่ฟักตัวเองได้ตลอดปี (Multivotine หรือ Polyvotine) เลี้ยงง่าย แข็งแรง ทนทานต่อสภาพอากาศที่ร้อนและแห้งแล้ง มีวงจรชีวิตประมาณ 40-45 วัน ส่วนใหญ่มีจำนวนไข่ต่อแม่ <400 ฟอง รังไหมมีสีเหลือง รูปร่างคล้ายกระสวย มีความยาวเส้นใยต่อรังสั้นประมาณ 200-300 m มีชื่อพันธุ์

เรียกตามเจ้าของพันธุ์ที่เลี้ยงต่อเนื่องได้ผลดี เช่น นางน้อยศรีสะเกษ1 นางเหลือง นางลาย นางเขียว นางสิ่ว นางตุ่ย นางหงอก นางไหม นางแก้ว หรือเรียกตามชื่อสถานที่ หมู่บ้าน ตำบล อำเภอ จังหวัด เช่น สำโรง แพงพวย กากีวนาสวรรค์ ทับทิมสยาม ไข่งู คอตั้ง สองพี่น้อง สำปอ ปราสาทเบง บางแก้ว เป็นต้น

ไหมพันธุ์ไทยปรับปรุง คือ ไหมพันธุ์ใหม่ที่พัฒนาขึ้นในประเทศไทย โดยมีเชื้อพันธุ์บางส่วนที่ไม่ใช่ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน เช่น ไหมจีน หรือไหมญี่ปุ่น จึงอาจเรียกว่าเป็นไหมไทยลูกผสม เพื่อให้ได้ลักษณะเด่นของทั้งไหมไทยพื้นบ้าน และมีผลผลิตที่มากขึ้น (เช่น มีจำนวนไข่ต่อแม่ >400 ฟอง และมีความยาวเส้นใยต่อรัง >400 m ขึ้นไป) พันธุ์ใหม่ที่ได้อาจเป็นชนิดที่ฟักตัวเองได้ตลอดปีเหมือนไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน หรือเป็นชนิดที่ฟักออกได้ในธรรมชาติปีละ 2 ครั้ง (Bivotine) ตามพันธุ์ต่างประเทศ มีรังไหมสีเหลือง มีชื่อพันธุ์ เช่น อุบลราชธานี 60-35 (พันธุ์ดอกบัว), อุดรธานี, สกลนคร 1, สกลนคร 2, กสก. 8, กสก. 11, และจุลไทยเบอร์ 4

ความสำคัญของกระบวนการฟอกกาวไหม

รังไหมประกอบด้วยโปรตีนเส้นใย (Fibroin 70–80%) เคลือบด้วยโปรตีนกาวไหม (Sericin 20–30%) และสารประกอบอื่นๆ ที่สะสมอยู่ในส่วนของกาวไหม (1-2%) ได้แก่ ไขมัน เม็ดสี และแร่ธาตุ (Lee, 1999) ทั้งกาวไหมและสารที่สะสมเหล่านี้ทำให้เส้นไหมแข็ง ขาดความเงางามและดูดซับน้ำได้ไม่ดี อีกทั้งเส้นไหมไทยมีเม็ดสีเป็นสีเหลือง ดังนั้นเพื่อให้ได้เส้นไหมที่อ่อนนุ่ม เงางาม และขาวขึ้นจนเหมาะสมสำหรับการย้อมสีให้ได้อย่างสม่ำเสมอ จะต้องนำเส้นไหมไปผ่านกระบวนการฟอกเพื่อกำจัดกาวไหม

การฟอกกาวไหมสามารถทำได้ทั้งก่อนและหลังการทอเป็นผืนผ้า และสามารถทำได้ในระดับที่แตกต่างกัน (Degree of degumming) เพื่อปกป้องเส้นไหมต่อการเสียดสีในขั้นตอนการทอผ้า หรือเพื่อผิวสัมผัสที่แตกต่างกัน แต่สำหรับการผลิตผ้าไหมไทย โดยเฉพาะผ้าไหมมัดหมี่ ต้องฟอกกาวให้หมดในขั้นตอนก่อนการทอ เพราะลวดลายของผ้าเกิดจากการออกแบบการมัดย้อมก่อน แล้วจึงนำเส้นไหมที่ย้อมต่างกันนี้ไปเรียงทอต่อกันบนกี่ เพื่อให้มีเอกลักษณ์ของการเหลื่อมล้ำจากรอยซึมของสีตามลวดลายที่ถูกมัด (ศศิวรรณ, 2539)

Sericin กับการฟอกกาวไหม

Sericin หรือโปรตีนกาวไหม เป็นชื่อเรียกรวมของกลุ่มโปรตีนที่ผลิตโดยส่วนกลางของต่อมไหมและมีกรดอะมิโน Serine เป็นองค์ประกอบหลัก มีขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 20–400 kDa (Garel et al, 1997; Takasu et al, 2002) เนื่องจากถูกสังเคราะห์จากยีน (Gene) อย่างน้อย 3 ยีน คือ *Ser1*, *Ser2*, และ *Ser3* (Takasu et al, 2010) และมีกลไก Alternative splicing ของ Gene transcript ที่ทำให้สังเคราะห์โปรตีนได้หลายแบบต่อ 1 ยีน นอกจากนี้ยังพบว่า มีกลไก Post-translational modification บน Sericin เช่น การเติมหมู่ไขมันที่ทำให้รังไหมไม่เปียกน้ำ และการเติมหมู่ไฮดรอกซิล ที่ช่วยให้เกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลได้ (Du et al, 2011)

Sericin ประกอบด้วยกรดอะมิโนประเภทที่มีขั้วและมีประจุ ได้แก่ Serine (34%), Aspartic (17%), Glutamic (5%), Arginine (5%), Threonine (4%) และ Lysine (4%) โดยน้ำหนัก จึงละลายน้ำได้ดีกว่า Fibroin ที่อยู่ด้านใน อย่างไรก็ตามความสามารถในการละลายน้ำของ Sericin ก็มีความแตกต่างแยกเป็นกลุ่มเรียงจากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุด ได้แก่ Sericin I, II, III, และ IV จากชั้นนอกสุดเข้าหาชั้นในสุด (Komatsu, 1980a) ความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนที่มีขั้ว (Ap) กับกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (An) และขึ้นอยู่กับปริมาณโครงสร้างที่ผนึกอย่างเป็นระเบียบ (Crystallinity) ของ Sericin ในแต่ละชั้นด้วย กล่าวคือ Sericin I มีโครงสร้างที่เป็น Random coil

มากกว่า β-structure จึงละลายน้ำได้ง่ายกว่า Sericin III และ IV ซึ่งมีโครงสร้างเป็น β-structure หรือมี Crystallinity มากกว่า

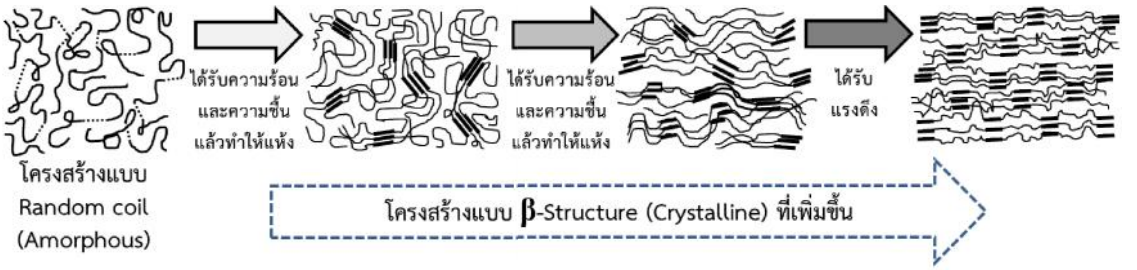
ปัจจัยที่มีผลต่อ Crystallinity ของ Sericin คือ ความร้อนและความชื้น ซึ่งสามารถทำให้ Sericin I เปลี่ยนไปมีโครงสร้างคล้าย Sericin IV ได้ โดยพันธะไฮโดรเจนที่อยู่ภายในโมเลกุล (Intra-molecular hydrogen bond) ของ Sericin จะถูกทำลายด้วยความร้อน ทำให้ Sericin คลายตัวและสร้างพันธะใหม่กับน้ำได้ (ละลายน้ำ) และเมื่อโมเลกุลของน้ำระเหยไปจะเกิดพันธะไฮโดรเจนใหม่ขึ้นระหว่างโมเลกุล (Inter-molecular hydrogen bond) ของ Sericin ทำให้เกิดเป็นเครือข่ายโมเลกุลและละลายน้ำได้ยากขึ้น ยิ่งทำให้ Sericin ละลายน้ำแล้วทำให้แห้งหลายรอบมากขึ้นเท่าไร หรือยิ่งระยะเวลาในการทำแห้งช้า จะยิ่งมี Crystallinity เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 1 (Komatsu, 1980a) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก Random coil ไปเป็น β-structure นี้สามารถสังเกตได้จากการเกิดเจล (Gelation) ของ Sericin (Zhu et al, 1995, 1998) นอกจากนี้แรงดึงยังมีผลต่อโครงสร้างของ Sericin ด้วย (Komatsu, 1980a)

สภาวะอากาศที่ใช้เลี้ยงไหมจึงมีผลต่อโครงสร้างของ Sericin และส่งผลถึงความสามารถในการสาวไหมออกได้ (Reelability) หากหนอนไหมทำรัง (Cocooning) ในสภาพอากาศร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 30 °C ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) 94% และอากาศถ่ายเทไม่สะดวก การสาวเส้นไหมออกจากรังจะทำได้ยาก เพราะโครงสร้างของ Sericin มี Crystallinity มาก ละลายได้ยาก มีคุณสมบัติเป็นกาว (Adhesive properties) และมีความต้านทานต่อการดึง (Stripping resistance) มากกว่า เมื่อเทียบกับการสาวไหมออกจากรังที่หนอนไหมพันธุ์เดียวกันทำขึ้นในสภาพอากาศที่เหมาะสม (23 °C, 67% RH) และอากาศถ่ายเทสะดวก (Zhu et al, 1995, 1998) จึงไม่น่าแปลกใจเมื่อพบว่า การสาวไหมไม่ออก สาวไหมได้ไม่สวย ในช่วงฤดูฝน เป็นปัญหาหนึ่งที่ระบุไว้ในรายงานการศึกษาสถานภาพอุตสาหกรรมไหมไทย (สุชาดาและคณะ, 2555)

เมื่อ Sericin ละลายน้ำได้ยากง่ายแตกต่างกัน การฟอกกาวไหมจึงมีบทบาทสำคัญเพื่อสลายพันธะเปปไทด์ของ Sericin จนมีขนาดเล็กลงแล้วทำให้ Sericin ละลายหลุดออกจากเส้นไหมได้ง่ายขึ้น ซึ่งสะท้อนให้เห็นได้จากระดับความแรงของสารเคมีและระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกกาวไหม ดังที่ Kumar และคณะ (2012) พบว่า หากหนอนไหมทำรังในสภาพอากาศร้อนชื้น (35 °C, 95% RH) จะต้องใช้ระดับความแรงในการฟอกกาวไหมสูง (ใช้สบู่ 7.5 g/L ผสมด่าง 0.75 g/L และต้มเป็นเวลา 60 นาที) และหากหนอนไหมทำรังในสภาพอากาศร้อนแห้ง (35 °C, 45% RH) ระดับความแรงในการฟอกกาวไหมจะต่ำ (ใช้สบู่ 7.5 g/L ผสมด่าง 0.5 g/L และต้มเป็นเวลา 45 นาที) ทั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบกับระดับความแรงในการฟอกกาวไหมปกติ (ใช้สบู่ 7.5 g/L ผสมด่าง 0.5 g/L และต้มเป็นเวลา 60 นาที) จากหนอนไหมที่ทำรังในสภาพอากาศปกติเหมาะสม (25 °C, 65% RH) และเปรียบเทียบที่ระดับการฟอกกาวเท่ากันที่น้ำหนักไหมหายไป (Degumming loss) 25%

กระบวนการสาวไหมและภูมิอากาศของประเทศไทย มีส่วนทำให้การฟอกกาวไหมไทยยากขึ้น **สาเหตุแรก** คือ ปริมาณกาวไหมขึ้นอยู่กับพันธุ์ไหม (Lee, 1999) และไหมพันธุ์พื้นบ้านของไทยมีกาวมากกว่าไหมต่างประเทศ **สาเหตุที่ 2** คือ การสาวไหมทำให้โครงสร้างของ Sericin เปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ การสาวไหมต้องมีการต้มรังไหมเพื่อให้ Sericin บางส่วนบนเส้นใยละลายก่อน แล้วจึงจะดึงเส้นใยจากหลายรังมารวมกันได้ จากนั้นจึงปล่อยให้เส้นไหมแห้ง หากสาวไหมลงตะกร้าแล้วปล่อยให้แห้งในภาชนะก่อนกรอเส้นไหมเข้าอัก จะได้เส้นไหมกลมและแห้งเร็วกว่าการสาวไหมเข้าอักทันที ซึ่งเส้นไหมจะถูกทับถูกดึง และ Sericin มีโอกาสเกิดเจลก่อนที่จะแห้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศที่ไม่ได้มีการควบคุม ดังนั้น Sericin

จึงกลายเป็นกาวเชื่อมระหว่างเส้นใยจากรังไหมหลายรังที่มาพันกันเป็นเกลียวแน่นจนได้เส้นไหมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และ **สาเหตุที่ 3** คือ ปริมาณและความไม่สม่ำเสมอของกาวไหมที่เคลือบอยู่บนเส้นไหมที่สาวออกมาได้ ทั้งนี้เกิดจากธรรมชาติของเส้นใยไหมที่มีขนาดและมีปริมาณกาวไหมเคลือบอยู่ไม่สม่ำเสมอตลอดความยาวของเส้นใยไหมทั้งรัง โดยเส้นใยไหมที่อยู่ชั้นนอกสุดของรังไหมจะมีขนาดใหญ่และมีปริมาณกาวไหมมากที่สุด ส่วนเส้นใยไหมชั้นในสุดจะมีขนาดเล็กและมีปริมาณกาวไหมน้อยที่สุด (Minagawa, 1980; Lee, 1999) ประกอบกับวิธีสาวไหมด้วยมือแบบพื้นบ้านของไทยที่ทำให้ได้เส้นไหมที่แตกต่างกันอย่างน้อย 3 ชนิด ดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 ภาพจำลองอธิบายลักษณะโครงสร้างของ Sericin

ตารางที่ 1 ชนิดของเส้นไหมสาวมือของไทย (มกษ. 8000-2555; ศิริพรและนันทวรรณ, 2555)

ชนิดหรือชื่อที่ใช้เรียก	วิธีสาวไหม	ลักษณะของเส้นไหมที่สาวได้
เส้นไหมชั้นนอก เส้นไหมลีบ เส้นไหมใหญ่ เส้นไหมหัว เส้นไหมชั้น 3	สาวเส้นไยชั้นนอก ประมาณ 15-20% ของเปลือกรังรวมทั้งปุยไหม	เส้นไหมหยาบกระด้าง มีขนาดเส้นใหญ่ไม่สม่ำเสมอ มีปุ่มปม และมีกาวไหมมากที่สุด ใช้เป็นเส้นไหมพุ่ง* ได้เพียงอย่างเดียวในการทอผ้า
เส้นไหมน้อย เส้นไหมเครือ เส้นไหมยอด เส้นไหมชั้น 1	สาวเส้นใยเฉพาะเปลือกชั้นในของรังไหมเท่านั้น หลังจากที่เอาปุยและเส้นใยชั้นนอกของเปลือกรังไหมออกไปก่อนแล้ว	เส้นไหมที่ได้จะอ่อนนุ่มเรียบเป็นเงามัน มีขนาดเส้นเล็กละเอียดสม่ำเสมอ มีกาวไหมน้อยที่สุด และนิยมใช้เป็นเส้นไหมยืน** ในการทอผ้า
เส้นไหนสาวรวม เส้นไหมสาวเลย เส้นไหมชั้น 2	สาวทั้งเปลือกรังไหมชั้นนอกที่ลอกเอาปุยไหมออกแล้ว และเปลือกรังไหมชั้นในทั้งหมดไปพร้อมกันในคราวเดียว ต้องมีการเพิ่มจำนวนรังไหมในหม้อต้มเพื่อรักษาขนาดของเส้นไหมที่สาวได้ให้มีความสม่ำเสมอ	เส้นหยาบ มีปุ่มปนแต่น้อยกว่าเส้นไหมชั้น 3 และมีขนาดเส้นใหญ่ที่ประกอบไปด้วยเส้นไหมที่มีขนาดและปริมาณกาวไหมแตกต่างกันพันกันตลอดเส้น

* เส้นดายที่ใช้เป็นแนวนอนตามความกว้างของผ้า (Weft)

** เส้นดายที่ใช้เป็นแนวตั้งตามความยาวของผ้า (Warp)

Fibroin กับการฟอกกาวไหม

Fibroin หรือโปรตีนเส้นใยไหม ถูกสร้างและเก็บไว้ในต่อมไหมทั้ง 2 ข้างของหนอนไหมในรูปของเหลว และถูกพ่นออกมาเป็นเส้นใยคู่ของ Fibroin และมี Sericin ล้อมรอบ เพื่อสร้างรังไหม Fibroin ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลัก 4 ชนิด ได้แก่ Gly (42%), Ala (32%), Ser (14%), และ Tyr (11%) โดยน้ำหนัก (Komatsu, 1980b) และมีหน่วยย่อยพื้นฐาน คือ โปรตีน H-chain (Heavy

chain) ขนาด 350 kDa โปรตีน L-chain (Light chain) ขนาด 26 kDa และ โปรตีน P25 ขนาด 30 kDa ในอัตราส่วนเป็นโมล (Mole) คือ 6:6:1 ตามลำดับ โดยมีพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide) ระหว่าง H-chain และ L-chain และมีพันธะไฮโดรเจน และ Hydrophobic interaction ระหว่าง H-chain กับ P25 (Inoue et al, 2000)

การศึกษาโครงสร้างของ Fibroin โดยใช้เอนไซม์ Chymotrypsin ย่อย Fibroin ที่เป็นของเหลว ทำให้ Lucus และ Rudall (1968) พบว่าสายโพลีเปปไทด์ (Polypeptide) ใน Fibroin มีลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็น 2 แบบ ได้แก่ ลักษณะการจัดเรียงแบบเป็นระเบียบ (Crystalline) ที่พบอยู่ในส่วนของตะกอน คิดเป็น 60% ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และอีก 40% เป็นลักษณะการจัดเรียงแบบไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) ที่พบอยู่ในส่วนของสารละลาย และพบว่าส่วนที่เป็น Crystalline ได้มาจากสายโพลีเปปไทด์ที่เป็นโครงสร้างหลักของ H-chain ซึ่งมีส่วนของกรดอะมิโนขนาดเล็กที่มีลำดับ Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser เกิดขึ้นซ้ำๆ กันเป็นหลัก และมีลำดับ Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr และ Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Val-Gly-Tyr ด้วยเช่นกันแต่น้อยกว่า ซึ่งส่วน Crystalline ของ Fibroin มีช่วงยาวกว่าจึงเสถียรกว่า Sericin (Komatsu, 1980a) และการที่สายโพลีเปปไทด์ในส่วน Crystalline ของ Fibroin ยึดกันแน่นด้วยพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลแบบ Antiparallel β-sheet โดยจัดเรียงสายโพลีเปปไทด์ไปในทิศทางขนานกับแกนของเส้นไหม ทำให้เส้นไหมเหนียวและแข็งแรง (Kaplan, 1998) ในขณะที่สายโพลีเปปไทด์ในส่วน Amorphous มีกรดอะมิโนที่มีขั้วและมีขนาดใหญ่ จากบางส่วนของ H-chain (Shimura and Katagata, 1980) รวมทั้ง L-chain และ P25 ด้วย โครงสร้างส่วน Amorphous นี้จึงยึดกันไม่แน่นเท่า และหากเส้นไหมได้รับความร้อนจะทำให้น้ำและสารเคมีแทรกเข้าไปภายในได้ง่ายกว่าส่วน Crystalline ดังนั้นการฟอกกาวไหมด้วยสารเคมีจึงทำให้ Fibroin ได้รับความเสียหายได้ (Ishikawa, 1980; Tsukada et al., 1992)

สายพันธุ์และสภาวะในการเลี้ยงไหมมีผลต่อความไม่สม่ำเสมอของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย Fibroin และลักษณะหน้าตัดของเส้นใย (Cross section) ที่อาจแตกต่างกันได้ตั้งแต่แบบสามเหลี่ยม (Triangular shape) ไปจนถึงแบบวงกลม (Circular shape) ซึ่งความไม่สม่ำเสมอเหล่านี้จะสะท้อนให้เห็นได้ในลักษณะของความมันวาว (Luster) ลักษณะสัมผัส (Texture) ตลอดจนความทนทานต่อสารเคมี ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่เลี้ยงได้ตลอดปี ดังเช่นสายพันธุ์ไทย เป็นชนิดที่มีความทนทานกว่าสายพันธุ์อื่น (Minagawa, 1980; Kumar et al, 2012)

หาก Fibroin ถูกทำลายจะสังเกตได้จากลักษณะของผิวเส้นไหมที่เป็นขุย (Surface fibrillation) มีความหมอง ย้อมติดสีไม่สม่ำเสมอ และสูญเสียความแข็งแรง (Tensile strength drop) (Minagawa, 1980) หรืออาจตรวจสอบความสมบูรณ์ของ H-chain, L-chain, และ P25 ได้ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) รวมทั้งประเมินได้จากเวลาในการแข็งตัวหรือการเกิดเป็นเจลที่นานกว่า 24 ชั่วโมง ภายหลังจากละลาย Fibroin ด้วย Lithium thiocyanate (LiSCN) แล้ว Dialysis เอา LiSCN ออกจนหมด (Yamada et al, 2001)

วิธีการฟอกกาวไหม

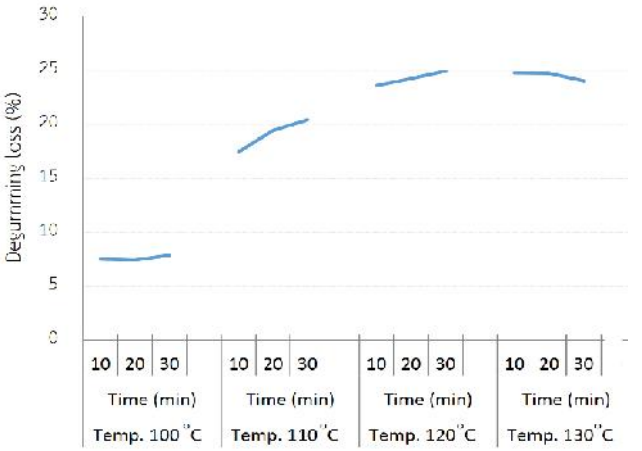
การฟอกกาวไหมเป็นกระบวนการที่ใช้ทั้งสารเคมี ความร้อน และพลังงานกล เช่น การกลับเส้นไหมไปมาให้สารฟอกกาวเข้าถึงเส้นไหมได้อย่างทั่วถึง แล้วทำให้ Sericin ละลาย (Dissolution) ถูกย่อยสลายด้วยน้ำ (Hydrolysis) และกระจายตัวหลุดออก (Dispersion) จากเส้นไหมได้ดี ทั้งนี้ความยากง่ายในการฟอกกาวไหมเกี่ยวข้องกับทั้งปริมาณ คุณภาพ และความสม่ำเสมอของกาวไหม ดังนั้นวิธีการหรือขั้นตอนในการฟอกกาวไหมจึงมีความหลากหลาย ไม่มีสูตรตายตัว ทั้งชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนผสม

ซึ่งเราอาจแบ่งวิธีการฟอกกาวไหมได้เป็น 5 กลุ่ม ตามชนิดของสารฟอกกาวไหม ได้แก่

กลุ่มที่หนึ่ง คือ การต้มเส้นไหมด้วยน้ำเปล่าที่อุณหภูมิและความดันสูง เช่น 50 psi (138 °C) เป็นเวลา 15 นาที (Takamine, 1931) หรือ 120-130 °C เป็นเวลา 30-60 นาที (Nagasuna, 1995) ดังรูปที่ 2 แสดงผลการฟอกกาวผ้าไหมญี่ปุ่นด้วยวิธีการต้มกับน้ำ ซึ่งต้องใช้อุณหภูมิและความดันสูงจึงจะฟอกกาวได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อผู้เขียนทดลองใช้อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที กับไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านลูกผสมระหว่าง นางสิ่ว นางลาย และนางตุ่ย แบบสาวรวมขนาด >400 denier (1 denier หมายถึง เส้นไหมที่มีความยาว 9,000 m มีน้ำหนัก 1 g) ก็ยังไม่สามารถกำจัดกาวไหมและเม็ดสีที่สะสมให้หมดไปได้

กลุ่มที่สอง คือ การต้มเส้นไหมกับน้ำด่างที่ได้จากการแช่ขี้เถ้าของใบและก้านกล้วยหรือวัสดุจากธรรมชาติอื่นๆ ตามภูมิปัญญาดั้งเดิมของเกษตรกรที่ใช้ในประเทศไทย (ศศิวรรณ, 2539) หรือใช้สารเคมี เช่น โซเดียมหรือโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (NaOH / KOH, 0.01-0.03%) [Myers and Stegemeyer, 1933] โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3, 0.05 N) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$, 0.05 N) และสารประกอบประเภทเอมีน เช่น Ethylenediamine $C_2H_4(NH_2)_2$ (0.025 M) (Chopra and Gulrajani, 1994) และ Triethylamine $N(CH_2CH_3)_3$ (0.25 N) (Chopra et al., 1996) และ**กลุ่มที่สาม** คือ การต้มเส้นไหมด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรด Tartaric (0.05 M) (Chopra and Gulrajani, 1994; Chopra et al., 1996)

การใช้กรดที่ pH <3 หรือเบสที่ pH >9 และใช้ความร้อนสูง เช่น อุณหภูมิ >95°C สามารถทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนเกิดการย่อยสลายได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง ภายในเวลาไม่เกิน 30 นาที (Karmakar, 1999) ดังนั้นวิธีการนี้จึงยากต่อการควบคุม และมีความเสี่ยงในการทำลายเส้นใยไหม เพราะสามารถกำจัดกาวไหมได้ดีในบริเวณหนึ่งในขณะที่ทำลายเส้นใย Fibroin ในอีกบริเวณหนึ่งได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเส้นไหมมีขนาดใหญ่และมีความหนาของกาวไหมไม่สม่ำเสมอกัน



รูปที่ 2 ระดับการฟอกกาวผ้าไหมด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ โดยใช้ผ้าไหมทอด้วยเส้นไหมขนาด 24 denier ควบ 4 เส้น *ข้อมูลจาก Nagasuna (1995)

กลุ่มที่สี่ คือ การต้มเส้นไหมกับสบู่ (Marseille soap) ที่ผลิตได้จากน้ำมันมะกอก และมีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ในระดับที่เป็นกลาง ซึ่งมีใช้กันมาตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1927 จนกลายเป็นมาตรฐานในการฟอกกาวไหมจนถึงปัจจุบัน (Takamine, 1931; Chopra et al, 1994, 1996) ข้อเสียของสบู่ คือ มีราคาแพง และต้องใช้เป็นปริมาณมากจึงจะมีผลทำให้แรงตึงผิวของน้ำลดลงจนทำให้ Sericin กระจายตัวหลุดออกได้ อีกทั้งการใช้สบู่ในสภาพน้ำกระด้างจะต้องมีการเติมสาร Chelating เพื่อไปจับ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ไว้ไม่ให้ตกตะกอนกับสบู่ และไม่ให้เหลือไปตกตะกอนอยู่ในถังย้อมสี ซึ่งมีผลทำให้ย้อมสีได้ไม่สม่ำเสมอ

การฟอกกาวไหมที่ได้รับความนิยมของประเทศไทย คือการต้มเส้นไหมกับสารละลาย Na_2CO_3 ผสมกับสบู่ซันไลต์ (Unilever, Thailand) ซึ่งมีราคาถูก การใช้ด่างร่วมด้วยทำให้สามารถลดปริมาณสบู่ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ได้ (ตารางที่ 2) โดยด่างจะทำให้ Sericin ถูกย่อยให้เล็กลงก่อนแล้วสบู่จึงช่วยละลายและทำให้ Sericin กระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น แต่ก็ขึ้นอยู่กับพันธุ์ไหมด้วย ไหมไทยมีปริมาณกาวไหมมากกว่าและแข็งแรงทนทานกว่าจึงต้องใช้ความเข้มข้นของสารเคมีสูงกว่า และใช้เวลาได้นานถึง 180 นาที ที่อุณหภูมิสูงได้ โดยที่ Fibroin ยังไม่ถูกทำลายจนสูญเสียน้ำหนักไปมากอย่างชัดเจน ส่วนไหมจีนใช้เวลาได้นานถึง 120 นาที ในขณะที่ไหมญี่ปุ่นถูกทำลาย นอกจากนี้ยังมีวิธีฟอกกาวไหมไทยแบบที่ใส่สารฟอกขาว เช่น โซเดียมไฮโดรซัลไฟต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร่วมด้วยในขั้นตอนเดียว (พุทธชาดและคณะ, 2545; พิศมัยและคณะ, 2548)

การปรับปรุงประสิทธิภาพในการฟอกกาวไหมเพื่อให้สามารถล้างคราบสบู่ออกได้ง่าย และได้เส้นไหมที่ขาวนุ่มขึ้นกว่าการใช้ 1% Marseille soap ทำได้โดยการใช้สบู่ที่ไม่ใช้เกลือของโซเดียมและโพแตสเซียม แต่ใช้ Monoethanolamine ร่วมกับกรดไขมันโอเลอิกหรือกรดไขมันอื่นๆ อย่างละ 0.4% (Harvey, 1931) และการนำสารซักล้างสังเคราะห์หรือดีเทอร์เจนท์ (Detergent) มาใช้แทนสบู่ เช่น Mineral oil sulfonates ร่วมกับด่าง (Myers and Stegemeyer, 1933; Reddish, 1936), SILKOBLANC BN (CHT R. Beitlich GmbH, Tübingen, Germany), และ Alphasol S-100 (Samsung Oil & Fat Corporation, South Korea)

อย่างไรก็ตาม Yamada และคณะ (2001) พบว่าการฟอกกาวไหมด้วยการต้ม (100 °C) กับ 0.5% สบู่ เป็นเวลา 30 นาที หรือ 0.05% Na_2CO_3 (pH 10) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำ 2 ครั้ง ไม่สามารถเตรียม Fibroin ที่มีความสมบูรณ์เพื่อการประยุกต์ใช้เป็นวัสดุทางการแพทย์และทางเทคโนโลยีชีวภาพได้ดีเท่ากับใช้สารละลาย 8 M Urea และ 0.5 M Mercaptoethanol ใน 0.04 M Tris-SO_4 buffer pH 7 ที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที

กลุ่มที่ห้า คือ การใช้เอนไซม์โปรดิเอส (Protease) (Freddi et al., 2003) และนอกจากนี้แล้วยังมีการพัฒนาวิธีการฟอกกาวไหมโดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound) ร่วมกับสารเคมี เพื่อช่วยเพิ่มอัตราเร็วในการฟอกกาวไหม โดยช่วยในการกระจายตัวของสารเคมีและช่วยให้กาวไหมหลุดออกได้ดีขึ้น และการให้ความร้อนด้วยการใช้คลื่นไมโครเวฟ (Microwave) เพื่อการกระจายความร้อนที่รวดเร็วและทั่วถึงกว่าเดิม (Mahmoodi et al, 2010a, 2010b)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการฟอกกาวไหมและชนิดไหมต่างกัน

เส้นไหม*	ความเข้มข้นของสารฟอกกาว (% owf)				อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	Degumming loss (%)
	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3				
	Wetting agent	สบู่ซันไลต์	สบู่ซันไลต์	Na_2CO_3			
ไทยพื้นบ้าน	10-20	-	-	-	95	60-120	23-25
	-	20-30	-	-	95	30-120	23-24
	-	-	5-10	6-8	80-95	30-180	24-26
ญี่ปุ่น (เลี้ยงในไทย)	10-20	-	-	-	95	90-120	22-23
	-	25	-	-	95	120	23-24
	-	-	5	4-6	95	120	24
				8	60-80		23
				8	95		33**
จีน	10-25	-	-	-	95	30-90	22-24
	-	25	-	-	95	30-120	22-24
	-	-	5-10	6-8	80-95	30-120	23-24

หมายเหตุ รวบรวมข้อมูลจาก พิศมัยและคณะ (2548); *ไม่ได้ระบุขนาดไว้ในรายงาน; **เส้นไหมถูกทำลาย (Over degumming)

คุณสมบัติของเอนไซม์กับการฟอกกาวไหม

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น เพื่อทำให้ปฏิกิริยาที่ปกติไม่เกิดขึ้นเองสามารถเกิดขึ้นได้อย่างจำเพาะเจาะจงในสภาวะที่ไม่รุนแรง เอนไซม์สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้น (Substrate) ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) โดยที่ตัวเอนไซม์เองไม่ได้ถูกใช้ให้หมดไปในปฏิกิริยา แต่ยังคงสามารถทำงานซ้ำได้หลายรอบ จึงไม่ต้องใช้ในปริมาณมาก นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์ยังขึ้นกับสภาวะ เช่น pH และอุณหภูมิ ดังนั้นเอนไซม์ที่มีปริมาณเท่ากันเมื่ออยู่ในสภาวะแตกต่างกันอาจจะทำงานได้ไม่เท่ากัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละตัว

เอนไซม์ที่เหมาะสมในการนำมาใช้ฟอกกาวไหม คือ เอนไซม์โปรติเอส (Protease) ซึ่งใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนด้วยน้ำ (Hydrolysis) เมื่อโปรตีนเป็นสายโพลีเปปไทด์ยาวของกรดอะมิโนต่างๆ ที่ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ดังนั้นสารตั้งต้นของเอนไซม์โปรติเอส คือ พันธะเปปไทด์ที่จำเพาะอยู่ในโปรตีน และมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังปฏิกิริยา คือ สายโพลีเปปไทด์ที่สั้นลงและ/หรือกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน

เอนไซม์โปรติเอสมีความจำเพาะในการเลือกตัดพันธะเปปไทด์ เช่น Trypsin ตัดพันธะเปปไทด์จำเพาะที่ตำแหน่งหลังกรดอะมิโนเบสิค เช่น Lysine และ Arginine ส่วน Chymotrypsin ตัดพันธะเปปไทด์จำเพาะที่ตำแหน่งหลังกรดอะมิโนอะโรมาติก (Worthington, 2011) ดังนั้นจึงเป็นเหตุให้ระดับของการสลายพันธะเปปไทด์ (Degree of hydrolysis) หรือรูปแบบและขนาดของสายเปปไทด์ที่ได้ภายหลังการฟอกกาวไหม ขึ้นอยู่กับความจำเพาะและความสามารถของเอนไซม์ในการเข้าถึงพันธะนั้น อีกทั้งจำนวน ตำแหน่ง และโครงสร้างแวดล้อมของพันธะที่จำเพาะนั้นในโปรตีนที่จะถูกย่อย

เมื่อ Sericin และ Fibroin มีความแตกต่างกัน ทั้งความหลากหลายของกรดอะมิโนของ Sericin และโครงสร้างที่ผนึกอย่างเป็นระเบียบและไม่ละลายน้ำของ Fibroin ทำให้

Fibroin มีความจำกัดในการถูกย่อยมากกว่า Sericin (Seves et al., 1998; Forlani et al., 2000) และส่งผลให้การฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะและเสียหายน้อยกว่าการใช้สารเคมี

การใช้เอนไซม์ยังมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สารเคมี คือ การฟอกกาวไหมสามารถเกิดขึ้นได้ภายใต้การควบคุมปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำกว่าและสภาวะไม่รุนแรงเท่ากับสารเคมี (25-65 °C และ pH 5-9) ซึ่งแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ เช่น Papain จากยางมะละกอ และเอนไซม์จากแบคทีเรียฟอกกาวไหมได้ที่อุณหภูมิ 40-50 °C ภายในเวลา 2 ชั่วโมง (Wallerstein, 1927, 1932a, 1932b) ในขณะที่ Wetting agent สบู่ซันไลท์ หรือ สบู่ซันไลท์ร่วมกับ Na_2CO_3 ไม่สามารถฟอกกาวไหมไทยและไหมจีน ได้ที่อุณหภูมิ 60 °C (pH >10) ภายในเวลา 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) (พิศมัยและคณะ, 2548) ดังนั้นการฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์จึงเป็นการป้องกันเส้นไหมทั้งจากการถูกย่อยสลายอย่างไม่จำเพาะจาก pH ที่ต่ำหรือสูงเกินไปและจากความร้อน อีกทั้งทำให้ประหยัดพลังงานและลดภาวะโลกร้อนได้

การนำเอนไซม์มาใช้ในการฟอกกาวไหม

การนำเอนไซม์มาใช้ในการฟอกกาวไหมไม่ใช่เรื่องใหม่ ปี ค.ศ. 1914 สหรัฐอเมริกาได้ออกสิทธิบัตรที่แสดงถึงการเริ่มนำ Trypsin เอนไซม์จากตับอ่อนของหมู ในชื่อของ Oropon ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องหนังโดย Otto Röhm มาใช้ฟอกกาวไหม โดยใช้ 0.12% ที่อุณหภูมิ 40-50 °C, pH > 8 (Meister, 1921) และในปี ค.ศ. 1922-1928 มีสิทธิบัตรที่แสดงการใช้งานเอนไซม์ Papain (0.025%) ที่อุณหภูมิ 50-75 °C, pH > 8 และการปรับปรุงสูตรโดยการเติม Activator ทำให้ลดปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการฟอกกาวไหมได้ (Wallerstein, 1927, 1930, 1932a) จากนั้นจึงมีการนำเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *B. mesentericus* 1-10% (v/v) มาใช้ในการฟอกกาวไหมที่อุณหภูมิ 40-60 °C, pH 7-8 ด้วย (Wallerstein, 1932b, 1934)

สาธารณรัฐเกาหลีได้ใช้เชื้อ *B. megaterium* SY-7 หมักกับไหมที่ต้องการฟอกกาวโดยตรง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Maltose, Ammonium nitrate, และสารละลาย Sericin ที่อุณหภูมิ 30–35 °C, pH 7-7.4 (Hyung, 1981) ส่วนประเทศญี่ปุ่นใช้เอนไซม์ Alkaline protease APG 501 จากเชื้อ *Bacillus* S.P. 9111-5 B ซึ่งแยกได้จากดิน และมีความจำเพาะต่อ Sericin ที่อุณหภูมิ 60–65 °C, pH 6.5-9 (Yasuto et al., 1991) และสาธารณรัฐอินเดียได้จดสิทธิบัตร (Patent Appn No. 2493/Del/98) ในการนำเอนไซม์จากเชื้อรา *Conidiobolus sp*. (3 ml/g fabric) มาใช้ฟอกกาวไหมที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 10 เพื่อทดแทนการฟอกกาวไหมด้วยสบู่ Marseille soap (Gulrajani et al., 2000) และปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมประเภท Detergent enzyme ได้แก่ Alcalase® (Novozymes) (10% owf) ซึ่งผลิตได้จาก *B. licheniformis* เอนไซม์ 3374-L และ เอนไซม์ GC 897-H (Genencor) (0.05-2 Units/g fabric) จาก *B. subtilis* และ *B. lentus* มาประยุกต์ใช้ในการฟอกกาวไหมที่อุณหภูมิ 60-65 °C, pH 8.5-10 (Chopra and Gulrajani, 1994; Freddi et al., 2003)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระดับการฟอกกาวเส้นไหมต่างชนิดในเวลา 2 ชั่วโมง ด้วยวิธีการฟอกกาวไหมและอุณหภูมิที่ต่างกัน

สารฟอกกาว (วิธีการ)	เส้นไหม* (ความเข้มข้นของสารฟอกกาว: % owf)	Degumming loss (%) จากการฟอกกาวที่อุณหภูมิ		
		60 °C	80 °C	95 °C
Wetting agent	ไทย (20%)	0	5	24
	ญี่ปุ่น (20%)	0	6	23
	จีน (25%)	1	5	23
สบู่ซันไลต์	ไทย (30%)	2	15	24
	ญี่ปุ่น (25%)	7	13	24
	จีน (25%)	0	14	24
สบู่ซันไลต์ และ Na_2CO_3	ไทย (10+8%)	1	25	25
	ญี่ปุ่น (5+8%)	23	23	33**
	จีน (5+8%)	6	22	23

หมายเหตุ รวบรวมข้อมูลจาก พิศมัยและคณะ (2548); *ไม่ได้ระบุขนาดไว้ในรายงาน; **เส้นไหมถูกทำลาย (Over degumming)

ประเทศไทยมีการทดลองนำ Papain มาใช้ที่อุณหภูมิ 25 °C และที่ 55-85 °C (ไม่ได้ระบุ pH ที่ใช้) (Nakpathom et al, 2009; Sasithorn and Luepong, 2009) และนำเอนไซม์ที่จำเพาะต่อ Sericin และไม่ย่อย Fibroin มาทดลองฟอกกาวไหมที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 8 ได้แก่ เอนไซม์ Cocoonase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ดักแด้ไหมใช้ในการละลาย Sericin ก่อนออกจากรังไหม (Rodbumrer et al, 2012) และเอนไซม์ที่ตรวจหาได้จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CRC_6NB (Pookajorn et al, 2013)

การใช้เอนไซม์ในการฟอกกาวไหมทำให้ได้เส้นไหมที่มีคุณภาพดีขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้สบู่ ซึ่งจะเห็นได้จากความสม่ำเสมอในการฟอกกาว ความขาว ความมันวาว และความนุ่มนวลของเส้นไหมที่เพิ่มมากขึ้น โดยที่เส้นไหมไม่ถูกทำลายหรือถูกทำลายได้น้อยกว่า นอกจากนี้ยังล้างเอนไซม์และกาวไหมออกได้ง่ายกว่าการใช้สบู่และ Detergent จึงสามารถทำให้ประหยัดน้ำได้มากกว่าถึง 10 เท่า และสะอาดไม่มีคราบสบู่ที่ส่งผลต่อการย้อมสีต่อไป และที่สำคัญเอนไซม์ถูกใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าและสามารถถูกย่อยสลายในธรรมชาติได้ง่ายกว่า จึงลดการสร้างมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่า

ข้อจำกัดในการฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์

แม้ว่าคุณภาพของเส้นไหมที่ดีกว่าจะทำให้เอนไซม์โปรติเอสเป็นสารฟอกกาวไหมที่น่าสนใจ แต่สาเหตุที่การใช้เอนไซม์ในการฟอกกาวไหมซึ่งมีมานานแล้วกลับไม่ได้รับความนิยมเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี คาดว่าจะเป็นด้วยข้อจำกัด ดังต่อไปนี้

1. อุตสาหกรรมไหมเป็นเรื่องของผลประโยชน์ทางการค้า ดังนั้นการเผยแพร่เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิต รวมทั้งเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องเป็นภาษาสากลจึงถูกจำกัด หรืออาจเปิดเผย แต่อยู่ในสิทธิบัตรของต่างประเทศ

2. เอนไซม์และสภาวะที่ใช้จากรายงานหรือสิทธิบัตรของต่างประเทศ ไม่สามารถนำไปใช้กับเส้นไหมไทยได้โดยตรง เพราะชนิดของเส้นไหมรวมทั้งสภาพโครงสร้างของกาวไหมมีความแตกต่าง ดังการทดลองใช้เอนไซม์ Alcalase® ที่ให้ผลแตกต่างกันกับเส้นไหม 3 ชนิด

คือ Murshidabad, Bangalore, และ Chinese (Chopra and Gulrajani, 1994)

3. เอนไซม์ที่มีอยู่ในท้องตลาดยังไม่เหมาะสมกับกาวไหมในรูปแบบของแข็งบนเส้นไหม จึงต้องมีการดำเนินกรรมวิธีก่อน (Pre-treatment) ด้วยการต้มกับสารละลายด่างหรือสบู่ และส่วนใหญ่มีการใช้สารซักล้างผสมร่วมกับเอนไซม์ด้วย ทั้งนี้เพื่อทำให้น้ำสามารถซึมเข้าสู่เส้นไหมได้ดีขึ้น และโครงสร้างของ Sericin เกิดการเปลี่ยนแปลงหรืออ่อนตัวลงก่อน จึงจะทำให้เอนไซม์สามารถฟอกกาวไหมได้ง่ายและเร็วยิ่งขึ้น และ/หรือต้องมีการดำเนินกรรมวิธีหลังการใช้เอนไซม์ (Post-treatment) เพื่อช่วยให้ Sericin ที่ถูกย่อยแล้วละลายและกระจายตัวออกจากเส้นไหมได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ต้องใช้ความร้อนกับเส้นไหม และปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีหรือระดับความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ก็น้อยกว่าการฟอกกาวไหมด้วยสารเคมีเพียงอย่างเดียว

4. เอนไซม์ที่มีใช้กันอยู่ทำลายเส้นใย Fibroin ได้เมื่อสัมผัสกับเส้นใยไหมเป็นระยะเวลานาน (Wongnarat and Srihanam, 2013) หรือเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้น เช่น การฟอกกาวไหมด้วย Papain (5% owf) ที่อุณหภูมิ 65-70 °C, 1 ชั่วโมง หรือ 10% owf ที่ 25 °C, 24 ชั่วโมง (Nakpathom et al, 2009) หรือ 4% owf ที่ 65-85 °C, 30 นาที (Sasithorn and Luepong, 2009) ยังฟอกกาวไหมได้ไม่สม่ำเสมอ ในขณะที่ผิวเส้นใยแตกเป็นขุย เมื่อสังเกตโดยใช้กล้อง Scanning electron microscope (SEM) เช่นเดียวกันกับการนำเอนไซม์ Alcalase® (0.001-0.06% v/v หรือ 2-3 ISU) มาใช้กับไหมไทยพื้นบ้านแบบสาวรวมขนาดใหญ่ ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 8 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Rodbumrer et al, 2012; Pookajorn et al, 2013) และการใช้ Alcalase® (1% v/v) กับไหมญี่ปุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C, 30 นาที (ไม่ได้ระบุ pH ที่ใช้) ซึ่ง Yamada และคณะ (2001) ได้ตรวจสอบความสมบูรณ์ของ Fibroin โดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสแล้วพบว่า H-chain ของ Fibroin ถูกทำลายไป

5. เอนไซม์สามารถทำงานได้เร็วมากขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาแต่เอนไซม์ไม่ทนความร้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาจุดสมดุลระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่ต้องการกับอัตราการสูญเสียความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ โดยการเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์และอุณหภูมิให้เหมาะสม

6. การมีทัศนะคติหรือความเข้าใจที่ไม่ถูกต้องในการใช้งานเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ทำงานได้ช้ากว่าสารเคมีโดยเปรียบเทียบการทำงานที่อุณหภูมิต่างกัน และการกำหนดปริมาณเอนไซม์ในลักษณะเดียวกันกับสารเคมี โดยไม่ได้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการทำงาน (Activity) ของเอนไซม์โดยตรง เช่น กำหนดโดยการใช้ร้อยละของน้ำหนักเอนไซม์ต่อเส้น/ผ้าไหม (on the weight of fabric: owf) หรือต่อสารละลายฟอกกาว ทำให้คลาดเคลื่อนและไม่สามารถเปรียบเทียบผลหรือทำซ้ำได้ เพราะสัดส่วนความสามารถของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมดหรือต่อน้ำหนักของเอนไซม์อาจไม่คงที่ โดยขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาเอนไซม์ รวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการฟอกกาวไหม

7. การขาดการตื่นตัวในเรื่องของการรักษาสิ่งแวดล้อมทำให้การเผยแพร่เทคโนโลยีในการฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์ยังไม่ไปถึงชุมชน จึงไม่มีการนำไปใช้งานอย่างแพร่หลาย

8. สารเคมีสามารถหาซื้อได้โดยง่ายกว่าในท้องตลาดและมีราคาถูกกว่าเอนไซม์ ประกอบกับความเคยชินในการใช้สารเคมีและการขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องการทำงานของเอนไซม์ ส่งผลให้ขาดความเชื่อมั่นและการยอมรับในการเปลี่ยนแปลง

แนวทางในการนำเอนไซม์มาใช้ฟอกกาวไหมไทย

ผู้เขียนได้ทำการวิจัยและขอเสนอแนวทางปฏิบัติเพื่อแก้ไขข้อจำกัดต่างๆ ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษาหาเอนไซม์ใหม่ที่มีความจำเพาะต่อ Sericin และไม่ทำลาย Fibroin จากธรรมชาติ โดยใช้เอนไซม์อื่นๆ เป็นเอนไซม์อ้างอิง เพื่อให้มีเทคโนโลยีที่เหมาะสมกับเส้นไหมไทย

เราได้เริ่มงานวิจัยการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย Sericin ในรูปแบบของแข็งบนเส้นไหมจากเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่ผสมอยู่ในตัวอย่างดินและน้ำที่เก็บได้จากแหล่งอุตสาหกรรมผลิตไหม โดยใช้วิธี Enrichment culture technique ภายใต้สภาวะ pH 7-8 และอุณหภูมิ 37 °C ซึ่งได้กำหนดไว้สำหรับการฟอกกาวไหม ใช้ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้านเป็นตัวชี้วัดการถูกย่อยสลายและเป็นแหล่ง Carbon และ Nitrogen เพียงแหล่งเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้วิธี Subculture เชื้อที่เจริญเติบโตได้ทุกๆ 2-14 วัน อย่างต่อเนื่อง เมื่อสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของเส้นไหม (Kaeyanon and Wongsaengchantra, 2005; Senatham and Wongsaengchantra, 2005; Pookajorn et al, 2013) นอกจากนี้เรายังได้พัฒนาวิธีตรวจสอบความสามารถในการย่อย Sericin และ Fibroin ของเอนไซม์โปรติเอสต่างๆ และใช้ตรวจสอบเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้ด้วย โดยเรียกวิธีการนี้ว่า Radial Diffusion in agar gel on Thin-layer Enzyme Assay (RD-TEA) (Rodbumrer et al, 2012)

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วทั้งหมดมีความสามารถในการใช้ไหมเป็นแหล่งอาหาร โดยผลิตเอนไซม์ย่อย Sericin ที่อยู่ในรูปแบบของแข็งบนเส้นไหมได้ และให้ผลในการย่อย Sericin และ Fibroin ตามวิธีการ RD-TEA เป็นบวกและเป็นลบ ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CRC_6NB (Pookajorn et al, 2013) ได้รับการเลือกมาศึกษาต่อ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้เป็นปริมาณมาก และเอนไซม์ไม่ย่อยสลายตัวเอง (Autohydrolysis) จึงมีความคงทนและเก็บได้นาน

เอนไซม์ที่ผ่านการคัดเลือกตามวิธีการ RD-TEA อีกชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์ Cocoonase ที่ดักแด้ไหมสร้างขึ้นเพื่อใช้ย่อย Sericin ให้อ่อนตัว แล้วผีเสื้อจึงถีบเส้นใยไหมให้แยกออกจากกันขณะออกจากรังไหม (Kafatos et al, 1967) เอนไซม์มีเสถียรภาพไม่ย่อยสลายตัวเอง จึงถูกนำมาทดลองใช้ในการสาวไหม และฟอกกาวไหม (Pandey et al, 2011; Rodbumrer et al, 2012)

2. การหาวิธีควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่เลือกได้

ยีนของโปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย CRC_6NB และ Cocoonase ได้ถูกโคลน (Clone) เพื่อใช้ในการผลิตเป็นเอนไซม์รีคอมบิแนนท์ (Recombinant enzyme: r-enzyme) ในเชื้อจุลินทรีย์ของห้องปฏิบัติการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต (Rodbumrer et al, 2012) และพบว่าทั้งเอนไซม์ r-Protease CRC และ r-Cocoonase มีความจำเพาะในการย่อย Sericin แต่ไม่ย่อย Fibroin (ตามวิธีการ RD-TEA) เช่นเดียวกันกับ n-Protease CRC และ n-Cocoonase จากแหล่งต้นกำเนิด (Native enzyme: n-enzyme) ซึ่งมีความแตกต่างจากเอนไซม์อ้างอิง Alcalase® ที่ย่อย Fibroin ได้แต่น้อยกว่า Sericin

3. การหาวิธีกำหนดปริมาณเอนไซม์เพื่อใช้ในการฟอกกาวไหมไทยต้นแบบให้เกิดผลสูงสุดและทำซ้ำได้

วิธีการตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Protease assay) แบบ RD-TEA มีความใกล้เคียงกับสภาวะที่จะนำเอนไซม์ไปใช้ในการฟอกกาวไหมมากกว่าวิธีการตรวจสอบโปรติเอสแบบทั่วไป เพราะแทนที่จะใช้โปรตีน Casein จากนมในลักษณะของเหลวเป็น Substrate วิธีการ RD-TEA นี้ใช้ Sericin หรือ Fibroin ที่อยู่ในรูปแบบผนึกกับพื้นผิวพลาสติก Polystyrene และไม่ละลายน้ำ (Immobilized form) จึงทำให้เอนไซม์กับ Substrate ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (Heterogeneous system) คล้ายกับกาว

ไหมที่อยู่บนเส้นไหม แต่กาวไหมในวิธีการ RD-TEA นั้นมีความสม่ำเสมอมากกว่า

เอนไซม์ r-Cocoonase มีความจำเพาะต่อ Sericin มากกว่า Casein (Rodbumrer et al, 2012) ทำให้เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีทั่วไป จะสิ้นเปลืองเอนไซม์มาก ดังนั้น RD-TEA จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมเบื้องต้นในการนำมาใช้วิเคราะห์และกำหนดปริมาณเอนไซม์ที่จะใช้ในการฟอกกาวไหม และเปรียบเทียบความสามารถในการฟอกกาวไหมระหว่างเอนไซม์ต่างๆ

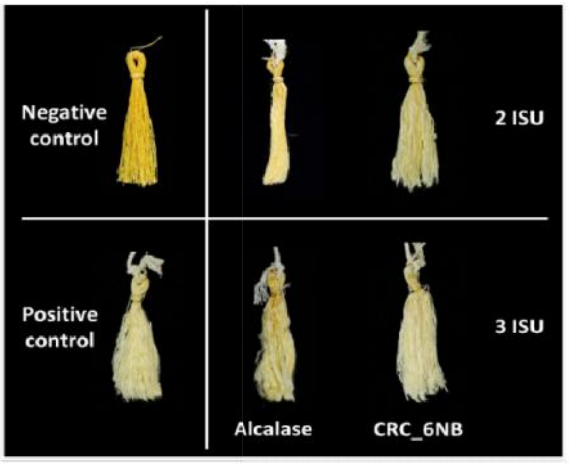
วิธีการ RD-TEA (Rodbumrer et al, 2012) ใช้การหยดเอนไซม์ลงในหลุมทดสอบ เพื่อให้เอนไซม์ไปย่อย Sericin ที่ผนึกไว้บนพื้นผิวพลาสติกให้หลุดออก แล้วตรวจสอบผลโดยการอังพื้นผิวนั้นกับไอน้ำ เพราะพื้นผิวที่ Sericin หลุดออกไปแล้วกับพื้นผิวที่ยังมี Sericin ผนึกอยู่จะมีลักษณะของหยดน้ำที่เกิดจากการควบแน่นและมีการหักเหของแสงที่แตกต่างกัน จึงเห็นบริเวณที่ถูกย่อย (Enzyme affected zone) รอบหลุมที่หยดเอนไซม์นั้นได้

ความสามารถของเอนไซม์ มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังนั้นตามวิธี RD-TEA เราจึงใช้วิธีกำหนดระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ในรูปหน่วยความสามารถของเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ระบุปริมาณเอนไซม์ที่จะใช้ในการฟอกกาวดังนี้คือ เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นระดับ 1, 2, และ 3 ISU (Immobilized Sericin Unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดวงโซนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1, 2, และ 3 cm ตามลำดับ โดยกำหนดให้ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบนั้นคงที่เท่ากับ 50 µl ต่อหลุมภายใต้สภาวะที่กำหนดและที่อุณหภูมิ 37 °C ภายในเวลา 16 ชั่วโมง

เนื่องจาก n-Cocoonase จากดักแด้ไหมมีระดับความเข้มข้นของเอนไซม์อยู่ที่ 2 ISU (Rodbumrer et al, 2012) เราจึงได้เลือกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ในการทดสอบการฟอกกาวไหมไว้อย่างน้อย 3 ระดับ คือ 1, 2, และ 3 ISU และเลือกเส้นไหมไทยพื้นบ้านแบบสาวรวมขนาดใหญ่ >400 denier มีกาวมาก และมีความไม่สม่ำเสมอของกาวไหม ให้เป็นต้นแบบของเส้นไหมที่มีแนวโน้มในการฟอกกาวไหมได้ยาก เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์ต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 8 โดยไม่มีการทำ Pre-treatment ใดๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอนไซม์ n-Cocoonase และ n-Protease CRC จากแหล่งต้นกำเนิด และ r-Protease CRC และ r-Cocoonase ที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ สามารถฟอกกาวไหมได้เรียบสม่ำเสมอ (Uniform) ใกล้เคียงกัน ในเวลาฟอกกาวเท่ากัน แต่ด้วยการใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน และยังพบว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (Purified enzyme) มีประสิทธิภาพในการฟอกกาวไหมดีกว่าเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (Crude enzyme) กล่าวคือใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยกว่า ทั้งนี้ประเมินจากการตรวจสอบเชิงคุณภาพของความสม่ำเสมอในการย่อย Sericin ออกจากเส้นไหมและดูการแตกของเส้นใย Fibroin ด้วยกล้อง SEM และด้วยตาเปล่าหลังจากย้อม Sericin ที่เหลืออยู่บนเส้นไหมด้วยสี Serius red F3B (DyStar) (C.I. Direct Red 80) (Pookajorn et al, 2013)

จากรายงานของ Rodbumrer และคณะ (2012) และ Pookajorn และคณะ (2013) เอนไซม์ที่คัดเลือกมาทั้ง 2 มีประสิทธิภาพในการฟอกกาวไหมได้ดีกว่า Alcalase® เพราะเมื่อใช้ความเข้มข้นเท่ากัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถฟอกกาวได้สม่ำเสมอทั่วถึงกว่า ซึ่งได้ผลลัพธ์คือเส้นไหมที่ขาว มันวาว และนุ่มนวลกว่า แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 เปรียบเทียบเส้นไหมไทยพื้นบ้านแบบสาวรวมขนาด >400 denier ก่อนการฟอกกาว (Negative control) และที่ผ่านการฟอกกาวไหมด้วยการต้มกับ 0.4% SILKOBLANC BN เป็นเวลา 45 นาที (Positive control) และด้วยการใช้ Crude enzyme จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CRC_6NB และเอนไซม์ Alcalase® ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากัน คือ 2 และ 3 Immobilized sericin unit (ISU) ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 8 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลเหล่านี้แสดงให้เห็นได้ว่า การใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการฟอกกาวไหมจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการฟอกกาวไหมที่มากเกินไปได้ (Over degumming) เพราะมีจุดยุติในการฟอกกาวไหม แม้ว่ากาวไหมจะหมดแล้ว เอนไซม์ก็จะไม่ทำลาย Fibroin ดังนั้นจึงทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของกระบวนการได้ง่ายและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเส้นไหมมีกาวไหมมากและไม่สม่ำเสมอ

แม้ว่าในการใช้เอนไซม์ให้ทำงานที่อุณหภูมิไม่สูงนัก จะทำให้ต้องใช้ระยะเวลานานกว่าการใช้สารเคมีที่อุณหภูมิสูง แต่ผู้ปฏิบัติงานสามารถละความสนใจเพื่อการทำกิจกรรมอื่นได้ เพียงแต่เตรียมปฏิกิริยาการฟอกกาวแล้วตั้งทิ้งไว้จนครบเวลา จากนั้นจึงมาทำการแยกเส้นไหมไปล้างด้วยน้ำร้อนในระยะเวลาสั้นๆ ดังนั้นเอนไซม์ที่จำเพาะจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยพัฒนากระบวนการฟอกกาวไหมโดยลดความเสียหายต่อเส้นไหม และลดระยะเวลาที่ต้องใช้แรงงานในกระบวนการได้

4. การส่งเสริมการใช้เทคโนโลยีสะอาด (Green Technology) ให้ครบทุกแนวทางปฏิบัติ เพื่อใช้ทรัพยากรให้ได้อย่างคุ้มค่า และเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์

การฟอกกาวไหมโดยใช้เอนไซม์ที่จำเพาะ ใช้เอนไซม์ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการใช้สารเคมี และไม่ต้องใช้สบู่ร่วมในกระบวนการ ทำให้ช่วยประหยัดพลังงานและน้ำ จึงถือว่าเป็นการลดการสร้างมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อมและลดการใช้ทรัพยากรได้ (Reduce) ดังนั้นในน้ำทิ้งฟอกกาวไหมจึงสะอาดเพราะไม่มีสบู่ที่ต้องกำจัดออก (Capar et al, 2009) มีเอนไซม์และ Sericin อยู่เป็นปริมาณมากซึ่งเราสามารถแยกเอนไซม์ได้ด้วยวิธี Affinity chromatography เพื่อนำไปใช้ซ้ำในกระบวนการรอบใหม่ได้ง่าย (Reuse) และยังเหลือ Sericin เป็นผลพลอยได้ไปใช้ประโยชน์ (Recovery) โดยแยกหรือทำให้ Sericin มีความเข้มข้นขึ้นด้วยการระเหยเอาน้ำออก การตกตะกอน การใช้แยกด้วย Membrane และการทำให้เป็นผง (Spray dry) และยังนำน้ำส่วนที่เหลือสุดท้ายจาก

กระบวนการ ซึ่งมีความสะอาดและปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อม ไปใช้รดน้ำต้นไม้ เช่น ต้นหม่อนได้โดยตรง (Recycle)

Sericin มีคุณสมบัติให้ความชุ่มชื้น ป้องกันแสง UV และป้องกันอนุมูลอิสระ จึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง รวมทั้งนำไปใช้ประโยชน์ด้านเภสัชกรรม และทางการแพทย์ (Zhang, 2002; Padamwar and Pawar, 2004; Sehnal, 2008) ดังนั้นเมื่อเรานำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการฟอกกาวไหม ทำให้ Sericin ที่มีอยู่มากบนเส้นไหมและมีสภาพเป็นของเสียที่ต้องทิ้งไปอย่างไม่มีราคาในกระบวนการฟอกกาวไหมแบบดั้งเดิมได้กลายเป็นสิ่งที่มีมูลค่า ซึ่งถึงแม้ว่าเราจะยังไม่อาจประเมินราคาที่แท้จริงได้ในขณะนี้ มูลค่าของ Sericin ก็น่าจะมีมากเกินกว่าเพียงแค่ชดเชยกับราคาของเอนไซม์ที่ต้องนำมาใช้ ทั้งนี้เพราะปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการใหม่น้อยกว่าปริมาณสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการเดิม ไม่ต้องเสียค่าบำบัดน้ำเสีย และที่สำคัญการใช้เทคโนโลยีสะอาดในกระบวนการผลิตจะช่วยเสริมคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์ผ้าไหมของไทย เสริมคุณค่าให้กับเครื่องหมายนกยูงสีทอง และยังสอดรับกับเวทีสากลในเรื่องการรักษาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

5. การสร้างความเข้าใจและความเชื่อมั่นให้กับชุมชนเกษตรกรเกี่ยวกับประโยชน์จากการใช้เทคโนโลยีเอนไซม์

การปรับเปลี่ยนความคิดหรือวิถีปฏิบัติของชุมชนเกษตรกรเป็นสิ่งที่ท้าทาย ดังนั้นการนำเสนอสิ่งที่สามารถจับต้องได้หรือเห็นผลได้อย่างเป็นรูปธรรมจึงเป็นสิ่งสำคัญ อีกทั้งต้องปฏิบัติและควบคุมได้โดยง่าย เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในกระบวนการใหม่ โดยในการนี้ผู้เขียนและคณะกำลังอยู่ในช่วงการพัฒนาชุดตรวจสอบเอนไซม์ฟอกกาวไหมที่สามารถตรวจสอบได้ภายในเวลาไม่เกิน 1-2 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นสื่อในการสาธิตและให้ความรู้แก่ชุมชนเกษตรกร รวมทั้งให้เกษตรกรได้รู้จักคุ้นเคยกับเอนไซม์และมีส่วนร่วมในการทดสอบและเสนอข้อคิดเห็นต่อไปด้วย

6. การบริหารจัดการที่ครบวงจร

กระบวนการต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมไหมไทย ต้องมีการบูรณาการอย่างเป็นระบบ โดยเพิ่มเติมเรื่องการวิจัยพัฒนาและผลิตเอนไซม์ การเผยแพร่และประชาสัมพันธ์กระบวนการฟอกกาวไหมด้วยเอนไซม์ให้แก่ชุมชนและอุตสาหกรรม และการบริหารจัดการในส่วนของผลพลอยได้ Sericin เพื่อเชื่อมโยงกลุ่มอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องให้สามารถเข้าถึงแหล่งวัตถุดิบนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันการสูญเสียคุณภาพของ Sericin ระหว่างการจัดเก็บและการขนส่ง นอกจากนี้ยังต้องมีการส่งเสริมเรื่องของการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เพื่อสร้างให้เป็นจุดขายที่โดดเด่นยิ่งขึ้นกับอุตสาหกรรมไหมไทย การบริหารจัดการที่ดีเหล่านี้จะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมระดับชุมชนและอุตสาหกรรมระดับประเทศได้อย่างยั่งยืนต่อไป

บทสรุป

การนำเอนไซม์โปรติเอสที่จำเพาะมาใช้ในกระบวนการฟอกกาวไหมมีส่วนช่วยปรับปรุงการผลิตในแง่ของการควบคุมกระบวนการให้มีประสิทธิภาพ และในแง่ของคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐาน และทำให้มีเทคโนโลยีเพื่อให้สามารถพึ่งพาตนเองได้สำหรับอนาคต โดยการเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์ในแง่เทคโนโลยีสะอาดและการประหยัดพลังงาน ที่กำลังมีการตื่นตัวเรื่อง Eco-textile labeling system เพื่อให้สามารถแข่งขัน และทำรายได้ให้ประเทศมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมอาชีพ สร้างความเข้มแข็งและยกระดับคุณภาพชีวิตของเกษตรกร ตลอดจนสร้างความเชื่อมโยงเครือข่ายภาคการผลิตอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องและสนับสนุนกับยุทธศาสตร์หม่อนไหมแห่งชาติ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอแสดงความขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยมหิดล ในการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ตั้งแต่ปี 2547 จนถึงปัจจุบัน เพื่อศึกษาองค์ความรู้ที่เกี่ยวกับการฟอกกาวไหม และพัฒนาวิธีการเพื่อตรวจสอบเอนไซม์ ตรวจสอบคุณภาพการฟอกกาวไหมและสามารถผลิตเอนไซม์ที่จำเพาะต่อการฟอกกาวไหม และขอขอบคุณนักศึกษาและนักวิจัยที่อยู่ในโครงการทั้งสิ้นด้วย

รายการอ้างอิง

กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2554). เครื่องหมายรับรองผลิตภัณฑ์ผ้าไหมไทย "ตรานกยูงพระราชทาน". แหล่งข้อมูล: http://qsds.go.th/newqsds/inside_page.php?pageid=7. ค้นเมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2558.

พิศมัย ลิขิตบรรณกร, สิรีรัตน์ จารุจินดา, และ นฤมล ศิริทรงธรรม. (2548). การปรับปรุงคุณภาพไหมไทย. รายงานการวิจัย. สำนักพัฒนาอุตสาหกรรมรายสาขา กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 148 หน้า.

พุทธชาด ลีปายะคุณ, อภิพันธุ์ เรืองโวหาร, และ ธรรมนูญ ธิดา. (2545). เอกสารแนะนำการสาวไหมและการฟอกย้อมสีไหม. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร. 34 หน้า.

มกษ. 8001-2553. รังไหมพันธุ์ไทยสีเหลือง. มาตรฐานสินค้าเกษตร. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 21 หน้า.

มกษ. 8000-2555. เส้นไหมดิบ เล่ม 1: เส้นไหมไทยสาวมือ. มาตรฐานสินค้าเกษตร. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 22 หน้า.

รสสุคนธ์ อนันต์ศฤงคาร และ ชาญชัย สิริเกษมเลิศ. (2556). Modern Thai Silk แนวทางการออกแบบไหมไทยร่วมสมัยสำหรับลูกค้าธุรกิจ. กรุงเทพฯ: สำนักงานบริหารและพัฒนาองค์ความรู้ (องค์การมหาชน) สำนักนายกรัฐมนตรี. 64 หน้า.

ศศิวรรณ ดำรงศิริ. (2539). ศิลปบนผ้าไหมมัดหมี่. กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). 64 หน้า.

ศิริพร บุญชู และ นันทวรรณ รักพงษ์. (2555). คู่มือการผลิตเส้นไหมไทยพื้นบ้านอีสาน. กรุงเทพฯ: กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 45 หน้า.

สุชาดา อุชชิน และ สมหญิง ชูประยูร. (2555). การศึกษาสถานภาพอุตสาหกรรมไหมไทย. รายงานการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 193 หน้า.

Capar, G., Aygun, S.S., and Rusen, G.M. (2009). Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters. J Membr Sci. 342: 179–189.

Chopra, S. and Gulrajani, M.L. (1994). Comparative evaluation of various methods of degumming silk. Indian J Fibre Text Res. 19: 76-83.

Chopra, S., Chattopadhyay, R., and Gulrajani, M.L. (1996). Low stress mechanical properties of silk fabric degummed by different methods. J Text Inst. 87: 542-553.

Du, X., Li, J., Chen, Y. (2011). Proteomic analysis of sericin in *Bombyx mori* cocoons. Biotechnol Bioprocess Eng. 16: 438-444.

Forlani, G., Seves, A.M., and Ciferri, O. (2000). A bacterial extracellular proteinase degrading silk fibroin. Int Biodeter Biodegr. 46: 271-275.

Freddi, G., Mossotti, R., and Innocenti, R. (2003). Degumming of silk fabric with several proteases. J Biotechnol. 106: 101-112.

Garel, A., Deleage, G., and Prudhomme, J.C. (1997). Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericins 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. Insect Biochem Molec Biol. 27(5): 469-477.

Gulrajani, M.L., Agarwal, R., and Chand, S. (2000). Degumming of silk with a fungal protease. Indian J Fibre Text Res. 25(1): 138-142.

Harvey, N.D.Jr. (Oct. 27, 1931). Degumming silk. US Patent 1,828,736.

Hyung, W.J. (Oct. 27, 1981). Degumming method of silk by fermentation. KR Patent 8,101,586 (Abstract).

Inoue, S., Tanaka, K., Arisaka, F., Kimura, S., Ohtomo, K., and Mizuno, S. (2000). Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. J Biol Chem. 275(51): 40517-40528.

Ishikawa, H. (1980). Fine structure and physical properties of silk fibers. *In* Structure of Silk Yarn, Part A: Biological and Physical Aspects. Enfield: Science Publishers. pp. 209-226.

Kafatos, F.C., Tartakoff, A.M., and Law J.H. (1967). Cocoonase I. preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. J Biol Chem. 242(7): 1477-1487.

Kaplan, D.L. (1998). Fibrous proteins: silk as a model system. Polym Degrad Stab. 59: 25-32.

Karmakar, S.R. (1999). Scouring. *In* Chemical Technology in the Pre-Treatment Processes of Textiles. Amsterdam: Elsevier Science. pp. 86-131.

Kaeyanon, C. and Wongsaengchantra, PY. (2005). Degumming of Thai silk with bacterial protease. *In* Proceedings of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonrachasima, Thailand. L0004.

Komatsu, K. (1980a). Chemical and structural characteristics of silk sericin. *In* Structure of Silk Yarn, Part B: Chemical Structure and Processing of Silk Yarn. Enfield: Science Publishers. pp. 47-85.

Komatsu, K. (1980b). Chemical and structural characteristics of wild cocoon and silk. *In* Structure of Silk Yarn, Part B: Chemical Structure and Processing of Silk Yarn. Enfield: Science Publishers. pp. 21-46.

Kumar, R.K.E., Lokesh, G., Nadiger, G.S., and Ananthanarayana, S.R. (2012). Degumming characteristics of silk filaments spun under varied climatic conditions of temperature and relative humidity. I. J. S. N. 3(1): 60-68.

Lee, Y-W. (1999). Silk Reeling and Testing Manual. FAO Agricultural Services Bulletin 136. Retrieved from: http://www.fao.org/docrep/x2099e/x2099e00.HTM. Accessed date: Aug 18, 2012.

Lucus, F. and Rudall, K.M. (1968). Extracellular fibrous proteins: the silks. *In* Comprehensive Biochemistry. New York: Elsevier. pp. 475-558.

Mahmoodi, N.M., Arami, M., Mazaheri, F., and Rahimi, S. (2010a). Degradation of sericin (degumming) of Persian silk by ultrasound and enzymes as a cleaner and environmentally friendly process. J Clean Prod. 18: 146-151.

Mahmoodi, N.M., Moghimi, F., Arami, M., Mazaheri, F. (2010b). Silk degumming using microwave irradiation as an environmentally friendly surface modification method. Fiber Polym. 11(2): 234-240.

Meister, J. (Nov. 22, 1921). Process for degumming textile fibers. US Patent 1,397,875.

Minagawa, M. (1980). Fine structure of silk fibers and lousiness fibers. *In* Structure of Silk Yarn, Part A: Biological and Physical aspects. Enfield: Science Publishers. pp. 185-208.

Myers, L.D. and Stegemeyer, L.A. (Feb. 7, 1933). Process of degumming silk. US Patent 1,896,494.

Nagasuna, O. (Apr. 12, 1995). Method for degumming silk fabrics and apparatus therefor. GB Patent 2,282,609A.

Nakpathom, M., Somboon, B., Narumol, N. (2009). Papain enzymatic degumming of Thai *Bombyx mori* silk fibers. Journal of Microscopy Society of Thailand. 23(1): 142-146.

Padamwar, M.N. and Pawar, A.P. (2004). Silk sericin and its applications: a review. J Sci Ind Res. 63: 323-329.

Pandey, J.P., Mishra, P.K., Kumar, D., Sinha, A.K., Prasad, B.C., Singh, B.M.K., Paul, T.K. (2011). Possible-efficacy of 26 kDa *Antheraea mylitta* cocoonase in cocoon cooking. Int J Biol Chem. 5(4): 215-226.

Pookajorn, S., Uyen, U., and Wongsaengchantra, P.Y. (2013). Enzymatic silk degumming using a protease from bacterial strain CRC_6NB. *In* Pure and applied chemistry international conference 2013: Global chemical science for green community, 23-25 January 2013. The Tide Resort, Bangsaen Beach, Thailand. 187-190.

Reddish, W.T. (Nov. 10, 1936). Method of removing sericin from silk. US Patent 2,060,529.

Rodbumrer, P., Arthan, D., Uyen, U., Yuvaniyama, J., Svasti, J., and Wongsaengchantra, P.Y. (2012). Functional expression of a *Bombyx mori* cocoonase: potential application for silk degumming. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 44(12): 974-983.

Sasithorn, N. and Luepong K. (2009). Silk degumming with dried latex of *Carica Papaya* Linn. Retrieved from: http://repository.rmutp.ac.th/handle/123456789/301. Accessed date: Jun 5, 2013.

Sehnal, F. (2008). Prospects of the practical use of silk sericins. Entomological Research 38: S1-S8.

Senatham, D. and Wongsaengchantra, PY. (2005). Preliminary characterization of proteases from bacteria GR_5_4, 4TS9-001, and H1C_13_8. *In* Proceedings of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonrachasima, Thailand. L0005.

Seves, A., Romano, M., Maifreni, T., Sora, S., and Ciferri, O. (1998). The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. Int Biodeter Biodegr. 42: 203-211.

Shimura, K. and Katagata, Y. (1980). Chemical structure of silk fibroin, *In* Structure of Silk Yarn, Part B: Chemical Structure and Processing of Silk Yarn. Enfield: Science Publishers. pp. 3-20.

Takamine, J. (Jul. 21, 1931). Process of degumming silk. US Patent 1,815,279.

Takasu, Y., Yamada, H., and Takasu, Y. (2002). Isolation of three main sericin components from the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*, Biosci Biotechnol Biochem. 66(12): 2715-2718.

Takasu, Y., Hata, T., Uchino, K., and Zhang, Q. (2010). Identification of Ser2 proteins as major sericin components in the non-cocoon silk of *Bombyx mori*. Insect Biochem Molec Biol. 40(4): 339-344.

Tsukada, M., Freddi, G., Nagura, M., Ishikawa, H., and Kasai, N. (1992). Structural changes of silk fibers induced by heat treatment. J Appl Polym Sci. 46: 1945-1953.

Wallerstein, L. (Oct. 11, 1927). Process of degumming silk. US Patent 1,644,764.

Wallerstein, L. (Jun. 10, 1930). Process of degumming silk. US Patent 1,763,112.

Wallerstein, L. (Apr. 26, 1932a). Process of degumming silk. US Patent 1,855,431.

Wallerstein, L. (Sept. 13, 1932b). Process of degumming silk. US Patent 1,877,097.

Wallerstein L. (Aug. 16, 1934). Improved process of treating silk. GB Patent 414,778.

Wongnarat, C. and Srihanam, P. (2013). Degradation behaviors of Thai *Bombyx mori* silk fibroins exposure to protease enzymes. Eng. 5: 61-66.

Worthington, K. and Worthington, V. (2011). Worthington Enzyme Manual. Retrieved from: http://www. worthington-biochem.com/index/manual.html. Accessed date: Mar 5, 2015.

Yamada, H., Nakao, H., Takasu, Y., and Tsubouchi, K. (2001). Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. Mater Sci Eng C. 14(1-2): 41-46.

Yasuto, W., Shigeyuki, T., Hirobumi, N., Shiyougo, K., Toshihiro, K., and Shiro, A. (Jan. 23, 1991). Novel alkali protease APG 501-producing bacterium. JP Patent 3,015,385A (Abstract).

Zhang, Y.Q. (2002). Application of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotech Adv. 20: 91-100.

Zhu, L.J., Arai, M., and Hirabayashi, K. (1995). Relationship between adhesive properties and structure of sericin in cocoon filaments. J Seric Sci Jpn. 64(5): 420-426.

Zhu, L.J., Yao, J.M., and Hirabayashi, K. (1998). Relationship between the adhesive property of sericin protein and cocoon reelability. J Seric Sci Jpn. 67(2): 129-133.

❑❑❑❑❑