การจัดทำฐานข้อมูลตำรับยาสมุนไพรในเขตจังหวัดปทุมธานี

กรวินท์วิชญ์ บุญพิสุทธินันท์ , ศุภชัย ไกรเทพ, ธิรินทร์ ห่อหุ้ม, ณัฏฐิกา อนุจิตรอนันต์
นภสร รัตนประเสริฐ และภูริชญา อินทร์เนตร

วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
**ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: wataru_dream@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การรักษาโรคแบบการแพทย์แผนไทยด้วยการใช้ตำรับยาสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาของประเทศมีมาแต่โบราณทั่วทุกภาคของประเทศ และตำรายาสมุนไพรที่ใช้ได้ผล มักจะถูกจดบันทึกในใบลาน สมุดข่อย หรือพับสา และได้มีการถ่ายทอดสืบต่อกันในตระกูลหรือผู้ใกล้ชิด แต่ผู้ที่เก็บรักษาอาจไม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญ และอาจเก็บรักษาไม่ดีซึ่งอาจทำให้ชำรุดและสูญหายได้ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดรวบรวมองค์ความรู้ที่ได้มีการบันทึกไว้ในเอกสารต่างๆ เช่น หนังสือโบราณ ใบลาน สมุดข่อย และพับสา เป็นต้น โดยในเบื้องต้นได้รวบรวมข้อมูลตำรับยาสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคที่มีอุบัติการณ์สูง ได้แก่ มะเร็ง เบาหวาน ความดันโลหิตสูง รวมไปถึงตำรับลดความอ้วน และตำรับยาอายุวัฒนะจากหนังสือโบราณและ ตำรายาสมุนไพรไทย และประเมินถึงความน่าเชื่อถือของตำรับยา จากการรวบรวม พบว่า สมุนไพรที่พบมากในตำรับยารักษามะเร็ง คือ ข้าวเย็นเหนือ,ข้าวเย็นใต้ และเหงือกปลาหมอ ตำรับยาเบาหวาน คือ ข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้ และเหงือกปลาหมอ ตำรับความดันโลหิตสูงคือ ขิง ขมิ้นอ้อย และระย่อม ตำรับลดความอ้วน คือ พริกไทย หญ้าแห้วหมู และบอระเพ็ด และตำรับยาอายุวัฒนะ คือ พริกไทย บอระเพ็ด และข่อย ตามลำดับ ทั้งนี้ สามารถนำตำรับยาสมุนไพรที่รวบรวมได้มาจัดทำเป็นหนังสือหรือฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการทำวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และอาหารเสริมได้ต่อไป

คำสำคัญ : ตำรายาสมุนไพร, การรวบรวม, คัมภีร์โบราณ, การวิจัยและพัฒนา

บทนำ

การรักษาโรคแบบการแพทย์แผนไทยซึ่งเป็นภูมิปัญญาของประเทศมาแต่โบราณ การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคนั้นมีมาเป็นเวลายาวนานในทั่วทุกภาคของประเทศ การตั้งตำรับยาสมุนไพรซึ่งอาจใช้ทั้งแบบชนิดเดี่ยวหรือผสมกับสมุนไพรอื่นๆ ตำรับยาสมุนไพรไทยมักอยู่ในรูปแบบการนำสมุนไพรตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปมารวมกัน และอาจต้องมีสมุนไพรบางชนิดเข้ามาเสริมเพื่อให้ยานั้นมีประสิทธิภาพในการรักษาตามที่ต้องการ ซึ่งถือว่าเป็นองค์ความรู้ของคนไทยในการผลิตยาสมุนไพรไทย เพื่อใช้รักษาโรคหรือบรรเทาอาการต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน อาการปวดและอักเสบ เป็นต้น อีกทั้งสามารถนำมารับประทานเพื่อเป็นยาอายุวัฒนะได้อีกด้วย องค์ความรู้เหล่านี้บางส่วนได้มีการบันทึกไว้ในเอกสารต่างๆ เช่น ใบลาน สมุดข่อย และพับสา เป็นต้น (รูปที่ 1) บางส่วนได้มีการถ่ายทอดสืบต่อ กันในตระกูลหรือผู้ใกล้ชิดเท่านั้น ตำรายาสมุนไพรเป็นจำนวนมากทั้งที่เป็นสมบัติส่วนตัว วัด หรือโรงเรียน ต่าง ๆ ซึ่งผู้ที่เก็บรักษาอาจไม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญของตำราสมุนไพรดังกล่าวดังนั้นบ่อยครั้ง

ที่จะพบผู้นำคัมภีร์หรือตำราสมุนไพรที่เป็นสมุดข่อย ใบลาน หรือพับสา มาขายให้ร้านรับซื้อของเก่า หรือวางขายทั่วไปหรือแม้แต่นำไปทำลายทิ้งหรือเผาไปกับเจ้าของเมื่อเสียชีวิตลง บางส่วนอาจมีการเก็บรักษาไม่ดีซึ่งอาจทำให้ชำรุดและสูญหายได้

รูปที่ 1 การจดบันทึกตำรายาสมุนไพรไทยดั้งเดิม ในใบลาน สมุดข่อย และพับสา

การใช้สมุนไพรมีการตื่นตัวขึ้นเป็นอันมาก ทั้งในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศที่พัฒนาแล้ว รวมทั้งประเทศไทย นอกจากนี้ได้มีการรวบรวมข้อมูลตำรับยาตามแหล่งความรู้ต่างๆ และจัดทำเป็นบันทึกหรือหนังสือตำรายาสมุนไพรไทยขึ้น เช่น หนังสือตำรับยาสมุนไพรของความรู้หมอพื้นบ้านจากเขื่อนสิรินธร หนังสือเพชรน้ำเอก และหนังสือแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ เป็นต้น

ปัจจุบัน ได้มีงานวิจัยด้านสมุนไพรจากตำรับยาหรือพืชสมุนไพรเพื่อรักษาโรคหรืออาการเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง [1] โรคเบาหวาน [2] และ อาการอักเสบ [3] อย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชียที่มีภูมิประเทศที่เหมาะแก่การเจริญของพืชสมุนไพร ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) สูงประเทศหนึ่งของโลกโดยมีถึง 7 % ของที่มีอยู่ในโลก โดยเป็นพืช 15,000 ชนิดและสัตว์ 16,495 ชนิด [4] อีกทั้งพืชสมุนไพรที่ขึ้นอยู่ตามป่าในที่สูง มักจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าพืชที่เจริญในเขตเมือง และอาจให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่า ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากมลภาวะจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งถือว่าเป็นข้อได้เปรียบในการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพร

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ คือ การรวบรวมตำรับยาสมุนไพรไทย จากหนังสือโบราณ และ ตำรายาสมุนไพรต่างๆ ซึ่งได้คัดเลือกตำรายาสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาที่มีอุบัติการณ์การเกิดสูง 5 โรค คือ ตำรับยามะเร็ง ตำรับยาเบาหวาน ตำรับยาความดันโลหิตสูง รวมไปถึง ตำรับยาลดความอ้วน และ ตำรับยาอายุวัฒนะด้วย เพื่อนำไปวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และอาหารเสริมต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

การรวบรวมตำรับยาสมุนไพรได้ถูกรวบรวมจากหนังสือโบราณ และ ตำรายาสมุนไพรต่างๆ จากหมอพื้นบ้าน และ แพทย์แผนไทย ในจังหวัดปทุมธานี เป็นระยะเวลา 2 เดือน ทั้งนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดกรองตำรับยาสมุนไพรในเบื้องต้น จำนวน 5 โรค โดยการใช้หลักเกณฑ์ในการเทียบโรคหรืออาการทางแพทย์แผนปัจจุบันกับโรคทางการแผนไทยนั้น ได้ประเมินจากอาการที่คล้ายคลึงกับแผนปัจจุบัน โดยได้อ้างอิงจากหนังสือเวชกรรมแผนไทยที่ได้รับการยอมรับ โดยตำรับยาสมุนไพรที่นำมารวบรวมต้องเป็นสมุนไพรที่หาง่าย เป็นที่รู้จัก และต้องไม่มีตัวยาที่เป็นวัตถุธาตุ สัตว์วัตถุ หรือ สารอื่นที่เป็นอันตราย เช่น สนิมเหล็ก เป็นต้น และตรวจสอบความน่าเชื่อถือโดยการพิจารณาพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นองค์ประกอบในตำรับยา เช่น การใช้ถั่วเขียวต้มกับน้ำตาลรับประทานเพื่อรักษาเบาหวาน เป็นตำรับที่ไม่น่ามีความเชื่อถือ เนื่องจากใช้น้ำตาลในการปรุงยาจะเป็นการกระตุ้นอาการของผู้ป่วยเบาหวานจึงไม่นำมารวบรวมในงานวิจัยนี้

ทั้งนี้เพื่อประเมินความปลอดภัยในการใช้ตำรับยา รวมถึงการจัดประเภทของตำรับยาสมุนไพร โดยการป้อรหัสให้กับตำรับยาดังกล่าว และการหาความถี่สมุนไพรอีกด้วย

ผลการทดลอง

จากการรวบรวมตำรับยาสมุนไพรจากตำรับยาหลวงปู่ศุข คัมภีร์วรโยคสาร หนังสือคัมภีร์ยาอายุวัฒนะ และจากตำรายาโบราณที่ได้จากใบลาน 2 เล่ม พับสา 2 เล่ม และข่อย 1 เล่ม นอกจากนี้ยังทำได้ทำการสัมภาษณ์หมอพื้นบ้านจากวัดน้ำวนอีกด้วยในจังหวัดปทุมธานี พบว่า ตำรับที่รวบรวมได้ ทั้งหมด 133 ตำรับ โดยเป็นตำรับยามะเร็ง 40 ตำรับ ตำรับยาความดันโลหิตสูง 21 ตำรับ ตำรับยาเบาหวาน 21 ตำรับ ตำรับยาอายุวัฒนะ 30 ตำรับ และตำรับยาลดความอ้วน 21 ตำรับ ซึ่งแต่ละตำรับมีพืชสมุนไพรที่เป็นองค์ประกอบต่างกันออกไป ซึ่งเกิดจากการผสมผสานองค์ความรู้และอาศัยภูมิปัญญาที่สั่งสมมาช้านาน

ตารางที่ 1 แสดงการตรวจสอบพืชสมุนไพรไทยที่เป็นองค์ประกอบในแต่ละตำรับ พบว่า พืชสมุนไพรที่พบมากที่สุด 3 อันดับแรกในตำรับยามะเร็งคือ ข้าวเย็นใต้

ตารางที่ 1: สมุนไพรไทยที่พบมากในตำรับยาสมุนไพรไทยประเภทต่างๆ

ประเภทตำรับยา	อันดับ	สมุนไพรที่พบ	ความถี่ (ตำรับ)
ตำรับยาแก้มะเร็ง	1	ข้าวเย็นใต้ (*Smilax microchina* T. koyama)	21
	2	ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)	20
	3	ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* L. Kurz)	10
ตำรับยาแก้ความดันโลหิตสูง	1	ขิง (*Zingiber officinale*)	4
	2	ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*)	3
	3	ระย่อม (*Rauvolfia serpentina* Benth)	2
ตำรับยาแก้เบาหวาน	1	ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)	7
	2	ข้าวเย็นใต้ (*Smilax microchina* T. koyama)	6
	3	เหงือกปลาหมอ (*A. illicifolius* L.)	4
ตำรับยาอายุวัฒนะ	1	พริกไทย (*Piper nigrum* L.)	21
	2	เหงือกปลาหมอ (*A. illicifolius* L.)	8
	3	บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.)	7
ตำรับยาลดความอ้วน	1	พริกไทย (*Piper nigrum* L.)	7
	2	หญ้าแห้วหมู (Cyperus rotundus L.)	6
	3	บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.)	4

ประเภทตำรับยา	อันดับ	สมุนไพรที่พบ	ความถี่ (ตำรับ)
ตำรับยาแก้มะเร็ง	1	ข้าวเย็นใต้ (*Smilax microchina* T. koyama)	21
	2	ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)	20
	3	ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* L. Kurz)	10
ตำรับยาแก้ความดันโลหิตสูง	1	ขิง (*Zingiber officinale*)	4
	2	ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*)	3
	3	ระย่อม (*Rauvolfia serpentina* Benth)	2
ตำรับยาแก้เบาหวาน	1	ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)	7
	2	ข้าวเย็นใต้ (*Smilax microchina* T. koyama)	6
	3	เหงือกปลาหมอ (*A. illicifolius* L.)	4

ข้าวเย็นเหนือ และทองพันชั่ง ในตำรับยาความดันโลหิตสูง คือ ขิง ขมิ้น และ ระย่อม และตำรับเบาหวาน คือ ข้าวเย็นใต้ ข้าวเย็นเหนือ และเหงือกปลาหมอ ตามลำดับ นอกจากนี้ยัง พบว่า พืชสมุนไพรที่พบมากในตำรับยาอายุวัฒนะ คือ พริกไทย เหงือกปลาหมอ และบอระเพ็ด ส่วนในตำรับยาลดความอ้วน คือ พริกไทย หญ้าแห้วหมูและบอระเพ็ด ตามลำดับ

ประเภทตำรับยา	อันดับ	สมุนไพรที่พบ	ความถี่ (ตำรับ)
ตำรับยาอายุวัฒนะ	1	พริกไทย (*Piper nigrum* L.)	21
	2	เหงือกปลาหมอ (*A. illicifolius* L.)	8
	3	บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.)	7
ตำรับยาลดความอ้วน	1	พริกไทย (*Piper nigrum* L.)	7
	2	หญ้าแห้วหมู (Cyperus rotundus L.)	6
	3	บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.)	4

จากการสรุปสมุนไพรที่พบบ่อยในตำรับ ไม่ได้หมายถึงพืชสมุนไพรชนิดนั้นเป็นยาหลักหรือยารองเพียงแต่เป็นการช่วยในคัดเลือกตำรับยาที่มีมาก เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในขั้นต่อไปได้สะดวกขึ้น การคัดเลือกจะทำโดยเรียงลำดับพืชสมุนไพรที่พบบ่อยในแต่ละตำรับ ทั้งนี้เป็นการประเมินในเบื้องต้นว่าพืช ชนิดนั้นน่าจะมีความสำคัญไม่มากก็น้อย จึงนำมาเป็นส่วนผสมในตำรับ จากนั้นจะให้คะแนนสมุนไพรแต่ละ ชนิดตามลำดับ และนำมาคำนวณว่ายาตำรับใดมีคะแนนสูงสุด ซึ่งจะทำการทดลองตำรับยานั้นก่อนตำรับอื่นๆ วิธีนี้จะมีประโยชน์ในด้านของการลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการวิจัย และอาจมีโอกาสได้ตำรับ ยาที่มีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย

นอกจากนี้ยัง พบว่า พริกไทย เป็นพืชสมุนไพรที่พบมากในตำรับยาสมุนไพรที่รวบรวมได้ (21.80%)

รองลงมาคือ ข้าวเย็นเหนือ (21.05%) และข้าวเย็นใต้ (20.30%) ตามลำดับ (ตาราง 2)

ตารางที่ 2: พืชสมุนไพรที่พบมากที่สุดในการรวบรวมตำรับยาสมุนไพรไทยดั้งเดิม 10 อันดับแรก

อันดับ	ชื่อสมุนไพร	ความถี่ (ตำรับ)
1	พริกไทย (*Piper nigrum* L.)	29
2	ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)	28
3	ข้าวเย็นใต้ (*Smilax microchina* T. koyama)	27
4	เหงือกปลาหมอ (*A. illicifolius* L.)	23
5	ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* L. Kurz)	16
6	แห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.)	16
7	บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* L.)	14
8	ขิงแห้ง (*Zingiber officinale*)	11
9	สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*)	10
10	สมอไทย (*Terminalia chebula*)	8

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพริกไทย พบว่า ใบสามารถ แก้ลมจุกเสียดแน่น ท้องอืดเฟ้อผลที่ยังไม่สุกนำมาเป็นเครื่องเทศ และ แต่งกลิ่นอาหารได้ เมล็ด ใช้ ขับลม ขับเสมหะ ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ บำรุงธาตุ อาหารไม่ย่อย และ ดอก ใช้รักษาตาแดง ถนอมอาหารหลายชนิด เช่น มะม่วงดอง เป็นต้น [5] และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพริกไทย พบว่า สามารถกระตุ้นการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ลดภาวะท้องเดิน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดไขมัน มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ลดการอักเสบ กดระบบประสาทส่วนกลางระงับอาการชัก ยับยั้งการกระจายของเซลล์มะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholine esterase กำจัดยุง แมลงวัน ศัตรูพืช [6] ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของข้าวเย็นเหนือ พบว่า ใช้หัว ในการแก้ประดง แก้มะเร็งคุดทะราด แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้น้ำเหลืองเสีย ฆ่าเชื้อหนอง แก้เส้นเอ็นพิการ แก้กามโรค เข้าข้อออกดอก ฝีแผลเน่าเปื่อยพุพอง ทำให้แผลฝียุบแห้ง แก้ประดง แก้เม็ดผื่นคัน ดับพิษในกระดูก แก้ปัสสาวะพิการ แก้อักเสบในร่างกาย นิยมใช้คู่กันทั้งข้าวเย็นใต้ ซึ่งเรียกว่า ข้าวเย็นทั้งสอง [7] และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้ พบว่า มีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 [8] และยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วย [9] ดังนั้นการพบพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด นี้เป็นองค์ประกอบในตำรับยาสมุนไพรต่างๆ อาจจะเป็นการเสริมฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการรักษาโรคต่างๆ ที่กล่าวมาได้

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมตำรับยาสมุนไพรครั้งนี้เป็นการรวบรวมตำรับยา ซึ่งถือว่าเป็นองค์ความรู้ และภูมิปัญญาของคนไทยมาตั้งแต่โบราณ ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำวิจัยต่อไปเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และประเมินความเป็นไปได้ในการรักษาโรค พิษวิทยาของตำรับยา นอกจากนี้ ยังสามารถหาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้รักษาโรคแต่ละชนิดได้ ดังนั้นการรวบรวมตำรับยาสมุนไพรไทยดังเดิมนี้ จะสามารถใช้ประโยชน์เพื่อการทำวิจัย และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา เครื่องสำอาง และอาหารเสริมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากวิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เอกสารอ้างอิง

[1] Zhanga, Y. and Li, P.P. (2010). Shu-Gan-Liang-Xue Decoction, a Chinese herbal formula, down-regulates the expression of steroid sulfatase genes in human breast carcinoma MCF-7 cells. Journal of Ethnopharmacology. 127: 620–624.

[2] Lu, J., Wang, J.S. and Kong, L.Y. (2011). Anti-inflammatory effects of Huang-Lian-Jie-Du decoction, its two fractions and four typical compounds. Journal of Ethnopha-macology.134 (3): 911-918.

[3] Ojekal, A.B., Kappo, M.A., Agbasoro, S. and Kazee, A. (2008). Preliminary study into the long term effects of a hypoglycaemic polyherbal formula (Yem-Kem) on some biochemical parameters in effects of a hypoglycaemic normal rabbits. African Journal of Biotechnology. 7 (10): 1581-1584.

[4] ศูนย์ศึกษาและวิจัยอุทยานแห่งชาติที่ 1. ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. แหล่งที่มา: http://www.nprcenter.com/nprc1/modules/smartsection/item.php?itemid=6

[5] วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย.พิมลักษณ์,กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียน สโตร์.

[6] ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. แหล่งที่มา: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=90

[7] ตำรับยา ตำรายาไทย; หน่วยปฏิบัติการงานวิจัยเคมีสารสนเทศ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[8] Itharat, A., Kejik, R., Tewtrakul, S. and Watanaperomskul, C. (2007). Antioxidant and anti-HIV-1 integrase compounds from *Smilax corbularia* Kunth. Planta Medica. 73: 559.

[9] Ruangnoo, S., Jaiaree, N., Makchuchit, S., Panthong, S.,Thongdeeying, P, Itharat, A. (2012). An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 30(4): 268-274.

Chromatographic Fingerprint Analysis and Antioxidant Activities of Herbal Ingredients in Thai Betel Quid

Chernkwan Mookprom[1], Philaslak Pooprommin[1], Pattamawan Ruangdet[1], Khemjira Jarmkom[1], Somnuek Suchaitanavanit[2], and Chanai Noysang[1*]

[1]*Thai Traditionnal Medicine College, Ragamangala University of Technology Thanyaburi, Pathumthani 12130, Thailand*
[2]*Institute of Thai Traditional Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health, BIOTEC Pilot Plant, Thailand Science Park, Pathumthani 12130, Thailand*
**Corresponding author. E-mail: c.noysang@yahoo.com*

Abstract

The preliminary phytochemical screening of Thai betel quid was done and HPTLC studies were carried out CAMAG HPTLC system. Antioxidative effects of ethanolic extracts from ingredients in Thai betel quid studied with the use of three in vitro assays - DPPH reduction spectrophotometric assay. HPTLC fingerprinting of ethanolic extract of *Acacia catechu* (L.f.) Willd. (catechu resin) revealed four spots with hR_f values in the range of 12, 25, 36, and 47; *Areca catechu* L. (areca nut) showed one spot with hR_f values in the range of 73; *Nicotiana tabacum* L. (tobacco leaf) showed two spots with hR_f values in the range of 50, and 69; *Piper betle* L. **(**betel leaf) showed six spots with hR_f values in the range of 7, 17, 24, 41, 59, 95. In the screening, the most efficient antioxidant activity was exhibited by *Acacia catechu*, tested at 1 mg/mL with inhibition values of 93.57±0.66% (EC_{50}= 0.04±0.01 μg/mL.). It can be concluded that HPTLC fingerprinting of herbal ingredients of Thai betel quid may be useful in the pharmaceutical industry and plant systematic studies.

***Keywords*:** Thai betel quid, Antioxidant, HPTLC fingerprinting

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) cause oxidative damage to nucleic acids, proteins, and lipids and are known to be associated with aging, carcinogenesis, and other diseases [1-2]. Research are becoming steadily more interested in discovering new antioxidants from natural sources. Medicinal plants used in traditional medicine contain many phytochemicals and play a major antioxidant role in helping endogenous antioxidants to neutralize activity to authenticate the medicinal properties of oxidative stress. Betel quid has commonly been used in South and Southeast Asia and Asia Pacific region including rural areas of Thailand for a long time. Because of its ancient history, its use is socially acceptable among all sections of society [3]. Thai betel quid is a combination of betel leaf, areca nut, catechu resin, and slaked lime (aqueous calcium hydroxide paste). Tobacco is commonly used in conjunction with Thai betel quid. Ingredients in betel quid produce complex interactions during chewing. For example, when betel quid is chewed with lime, arecoline and guvacoline are metabolized into arecaidine and guvacine, respectively [1]. Research evidence on the effects of Thai betel quid towards oral cancer and oral soft tissue lesions is ample [4-14]. However, only a limited number of studies have been reported on chemical constituents and pharmacological activity of Thai betel quid. Therefore the aim of the present study were to evaluate two main aims: to establish the fingerprint profile and evaluate the antioxidant activities of ethanolic extracts of herbal ingredients in Thai betel quid.

Materials and Methods

Plant material

The dried plant material from following species was studied: *Acacia catechu* (L.f) Wild (catechu tree), *Areca catechu* L. (betel nut), *Nicotina tabacum* L. (tobacco), and *Piper betel* L. (betel leaf). The materials were purchased from local indigenous market (Chachoengsao, Chiang Mai, and Nakhon Pathom, Thailand) in November 2012. The taxonomic identification was done by Dr. C. Noysang, Thai Traditional Medicine College, Rajamangala University of Technology. The voucher specimens have been deposited in Royal Forestry Department, Bangkok, Thailand. Plant information is shown in Figure 1 and Table 1.

Chemicals and apparatus

2,2 - Di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH), and ascorbic acid were purchased from Sigma Aldrich-Fluka. For absorbance measurements, Biochrom Anthos Zenyth 340 Microplate Reader with Optional Temperature Control was used. A HPTLC scanner with computer system and WinCats Version Software were obtained from Camag (Muttenz, Switzerland). Camag Linomat V was used as applicator. Separation was done on silica gel F_{254} HPTLC precoated plates purchased from Merck (Germany).

Samples preparation

The powdered raw material of Catechu resin, Tobacco dried leaf, Betel fresh leaf (10 g) was extracted with 100 mL of 95% ethanol and the powdered raw material of Areca nut (10 g) was extracted with 100 mL of 70% ethanol using shaker for 30 min at 25°C and filtrated. The solvent were completely evaporated to dryness using rotary flash evaporator (Buchi type). Different extracts were prepared from the resultant crude ethanol and used for further investigations of HPTLC fingerprint and *in vitro* antioxidant activity.

HPTLC analysis

Chromatography was performed on silica gel F_{254} HPTLC pre-coated plates. Samples were applied on the plates as band of 8-10 mm width using a Camag Linomat V sample applicator at the distance of 8 mm from the edge of the plates. The mobile phase composed of chloroform-acetone-formic acid (75:16.5:8.5), chloroform-ethanol (60:40), toluene- ethyl acetate-diethyl amine (70:20:10), and toluene-ethyl acetate (93:7). After development, plates were dried and derivatised in Dragendorff, KOH, Vanillin-sulphuric acid reagents. The fingerprints were evaluated at 366 nm in fluorescence mode with a WinCats and VideoScan software.

Antioxidant activity assay

The extracts were diluted in ethanol solution at the concentration of 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, and 0.01 mg/mL. 100 µl aliquots of the extract were mixed with 900 µl of the ethanolic DPPH solution (0.25g/L). The reduction of the DPPH free radical was measured by reading the absorbance at 517 nm and related to the absorbance of the control without the herbal drugs. Inhibition ratio (percent) was calculated from the following equation: % inhibition [(absorbance of control - absorbance of sample)/absorbance of control] x 100%. Ascorbic acid was used as positive controls.

Results and Discussion

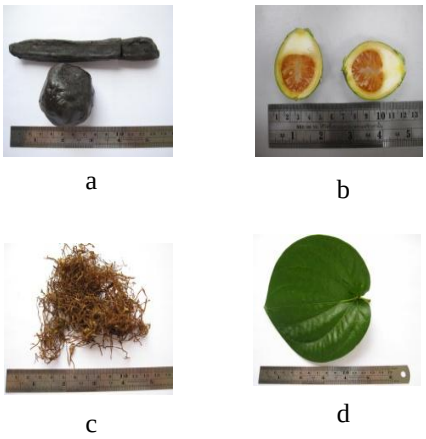

Figure 1. Herbal ingredients of Thai betel quid; (a) *Acacia catechu* (L.f.) Willd.; (b) *Areca catechu* L.; (c) *Nicotiana tabacum* L.; (d) *Piper betle* L.

Table 1: Name and Thai indigenous use of plants studied

Botanical name	Common name	Family	Indigenous use	Parts use
Acacia catechu (L.f.) Willd.	catechu tree	LEGUMI-NOSAE (MIMOSOIDEAE)	Used as a mouthwash, sore throats, and diarrhea.	Resin
Areca catechu L.	betel nut	PALMAE	Used fresh or it may be dried and cured before use, by sun-drying, baking or roasting.	Nut
Nicotiana tabacum L.	tobacco	SOLANA-CEAE	Used as stimulation and relaxing	Leaf
Piper betle L.	betel leaf	PIPERA-CEAE	Used a stimulant, an antiseptic and a breath-freshener.	Leaf

HPTLC analysis

The fingerprint of the constituents present in samples was recorded using Camag TLC visualizer and WinCats Software. The chromatograms (Figure 2) showed spots which are characteristic for several medicinal plant species. In particular, HPTLC fingerprinting of ethanolic extract of *Acacia catechu* (L.f.) Willd. (catechu Tree) revealed four spots with hR_f values in the range of 12, 25, 36, and 47; *Areca catechu* L. (betel nut) showed one spot with hR_f values in the range of 73; *Nicotiana tabacum* L. (tobacco) showed two spots with hR_f values in the range of 50, and 69; *Piper betle* L. (betel leaf) showed six spots with hR_f values in the range of 7, 17, 24, 41, 59, 95.

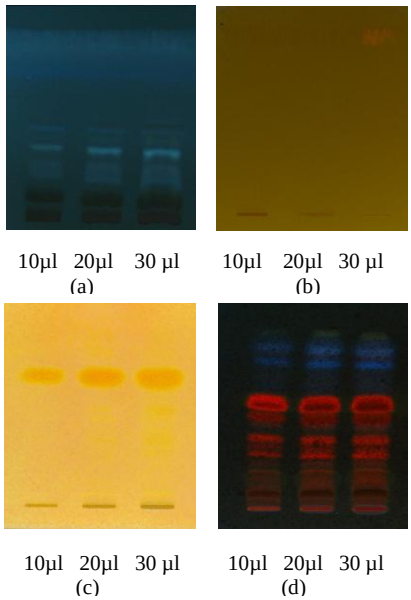

Figure 2. HPTLC-fingerprint of the ethanolic extracts (a) *Acacia catechu* under UV 366 nm; (b) *Areca catechu* under UV 366 nm; (c) *Nicotiana tabacum* before derivatization under daylight; and (d) *Piper betle* under UV 366 nm. The solvent systems (chloroform-acetone-formic acid (75:16.5:8.5), chloroform-ethanol (60:40), toluene- ethyl acetate-diethyl amine (70:20:10), and toluene-ethyl acetate (93:7)) are suitable for the analysis of *Acacia catechu*, *Areca catechu*, *Nicotiana tabacum* and *Piper betle*, respectively.

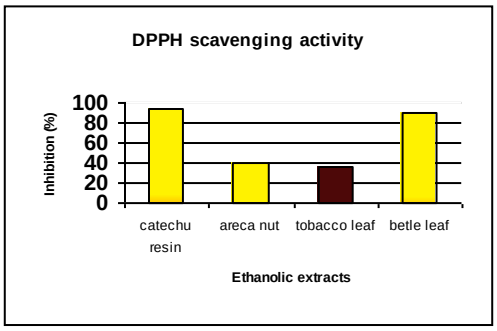

Figure 3. DPPH scavenging activity of the herbal ingredients of Thai betel quid extracts and standards at 1mg/ mL; mean with 3 replicates each one (mean± S.D. (n=3))

Free radical scavenging assay

The DPPH antioxidant assay is based on the ability of DPPH, a stable free radical, to decolorize in the presence of antioxidants. Comparison of the antioxidant activity of the ethanolic extracts (at a dose of 1mg/ mL and reference standards (at doses of 1 mg/mL) is shown in Figure 3 and Table 2. The ethanolic extract of *Acacia catechu* and *Piper betel* exhibited an efficient (93.57±0.66%, and 89.43±2.02%, respectively) inhibition of DPPH free radical. Reference standards ascorbic acid showed significant inhibition activity 90.88±4.42%.

Table 2: DPPH scavenging activity of ethanolic extract of herbal ingredients in Thai Betel Quid (EC_{50} values)

Sample	EC_{50} (µg.mL^{-1})
Acacia catechu (L.f.) Willd.	0.036(±0.010)
Areca catechu L.	0.042(±0.005)
Nicotiana tabacum L.	0.673(±0.261)
Piper betle L.	0.060(±0.002)
Ascorbic acid	0.065(±0.05)
Alpha – tocopherol	42.83(±8.46)
Gallic acid	0.07(±0.01)

Values represent mean± S.D. of three replicate

Conclusions

In the present study, the ethanolic extracts of herbal ingredients of Thai betel quid to investigate the HPTLC fingerprint profile and antioxidant activities. The solvent systems (chloroform-acetone-formic acid (75:16.5:8.5), chloroform-ethanol (60:40), toluene- ethyl acetate-diethyl amine (70:20:10), and toluene-ethyl acetate (93:7)) are suitable for the analysis of *Acacia catechu*, *Areca catechu*, *Nicotiana tabacum* and *Piper betle*, respectively. The antioxidant activities of the ethanolic extract of *Acacia catechu*, possess very strong scavenging activity on DPPH free radical with EC_{50} values of 0.036±0.010.

Acknowledgments

Thanks is due to Dr.Winitchai Supanida from Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Imprevent Institute (KAPI), Kasetsart University, Thailand for DPPH inhibition assay.

References

[1] I, C.W., Ping, H.C., Chien, J.W., Deng C.W., Shih M.T., Bai H.C., et al. (2010). Quantification of blood betel quid alkaloids and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in humans and their association with betel chewing habits. Journal of Analytical of Toxicology. 34: 325-331.

[2] Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. and Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radical Biology and Meicine. 32: 1102–1115.

[3] Gupta, P.C. and Ray, C.S. (2004). Epidemiology of betel quid usage. Annal Academy of Medicine Singapore. 33: 31S-36S.

[4] Chatrchaiwiwatana, S. (2006). Dental caries and periodontitis associated with betel quid chewing: analysis of two data sets. Journal of the Medical Association of Thailand. 89: 1004-1010.

[5] Yang, Y.H., Lien, Y.C., Ho, P.S., Chen, C.H., Chang, J.S, Cheng, T.C., et al. (2005). The effects of chewing betel quid with and without cigarette smoking on oral submucous fibrosis and oral mucosal lesions. Oral Diseases. 11: 88-94.

[6] Lee, C.H., Lee, J.M., Wu, D.C., Hsu, H.K., Kao, E.L., Huang, H.L., et al. (2005). Independent and combined effects of alcohol intake, tobacco smoking and betel quid chewing on the risk of esophageal cancer in Taiwan. International Journal of Cancer. 113: 475-482.

[7] Shieh, D.H., Chiang, L.C., Lee, C.H., Yang, Y.H. and Shieh, T.Y. (2004). Effects of arecoline, safrole, and nicotine on collagen phagocytosis by human buccal mucosal fibroblasts as a possible mechanism for oral submucous fibrosis in Taiwan. Journal of Oral Pathology and Medicine. 33**:** 581-587.

[8] Jacob, B.J., Straif, K., Thomas, G., Ramadas, K., Mathew, B., Zhang, Z.F., et al. (2004). Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. Oral Oncology. 40: 697-704.

[9] Chang, K.C., Su, I.J., Tsai, S.T., Shieh, D.B. and Jin, Y.T. (2002). Pathological features of betel quid-related oral epithelial lesions in taiwan with special emphasis on the tumor progression and human papillomavirus association. Oncology. 63: 62-69.

[10] Shiu, M.N. and Chen, T.H. (2004). Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. European Journal of Cancer Prevention. 13: 39-45.

[11] Wang, L.Y., You, S.L., Lu, S.N., Ho, H.C., Wu, M.H., Sun, C.A., et al. (2003). Risk of hepatocellular carcinoma and habits of alcohol drinking, betel quid chewing and cigarette smoking: a cohort of 2416 HBsAg-seropositive and 9421 HBsAg-seronegative male residents in Taiwan. Cancer Causes Control. 14**:** 241-50.

[12] Reichart, P.A., Dietrich, T., Khongkhunthian, P. and Srisuwan, S. (2003). Decline of oropharyngeal cancer in Chiang Mai province, Thailand, between 1988 and 1999. Oral Oncology. 39: 569-573.

[13] Chiba, I. (2001). Prevention of betel quid chewers' oral cancer in the asian-pacific area. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2: 263-269.

[14] Lee, C.H., Ko, Y.C., Huang, H.L., Chao, Y.Y., Tsai, C.C., Shieh, T.Y., et al. (2003). The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan. British Journal of Cancer. 88: 366-372.

Comparative High Alcohol Production in the Fermentation of Durian Peels and Jackfruit Wastes

Siriphatr Chamutpong [1], Nednapit Noitim[2], Chanya Wongjan[2], and Duongruitai Nicomrat*[2]
[1] *Thai Traditional Medicine College, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, 8 Phahonyothin 87 Rd., Pathum Thani, 12130 Thailand,* [2]*Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Phra Nakhon, 399 Samsen Road, Dusit, Bangkok 10300*
**Corresponding author. Email: Duongruitai@yahoo.com*

Abstract

Thailand agricultural waste materials have been currently and acceptably used as a carbohydrate source for fermentation process for ethanol. In this research, high contents of starch of waste materials such as durian peels compared with the rind and pulp wastes from the shell of the Jackfruit were comparatively tested for their cellulosic digestion. Either natural habituating microorganisms on the waste itself or the isolated active strains, could be successfully achieved in 25-30 days for the digestion (8-10 % Brix). There was no significant difference between these two materials in terms of digestion speed and the ability to digest cellulose and starch to sugar if the inoculums added were firstly activated at 10^9-10^{12} cells/ ml of the culture. At this step, for 25- 30 days of the cellulose digestion from durian peels, many varieties of microbial species were observed, especially fungi types white and black *Aspergillus* spp. as well as bacilli. The rind and pulp wastes of jack fruit, oppositely, revealed most bacteria types cocci and small rods as well as *Aspergillus* spp. Then, the second step of alcohol production, in durian waste sample, the starch and sugar moieties could possibly be a bit better retrieved for alcohol production than those of jack fruit (60 and 55% w/w of wastes, respectively). It showed saturated 10-15% v/v of ethanol contents in about 15 days and 22 days in durian and jack fruit wastes, respectively. Moreover, jackfruit wastes could comparably be a good source for ethanol production as same as durian peels if all optimizing conditions at each step were considerably done.

For all these results, any biomaterial wastes could comparably be good sources for ethanol production if all essential parameters such as sugar contents, microorganisms and yeast strains, and pH were considerably optimized.

***Keywords**:* Fermentation, Ethanol, Yeast, Cellulosic Materials

Introduction

Thailand with a significant agronomic-based economy can use current technology for fuel ethanol fermentation. Not only the molasses from sugar-cane or sugar but the agricultural waste products can also provide suitable substrates for ethanol production (Aristidou and Penttila 2000). By ethanol production via yeast fermentation, many investigations of the role of fermentation parameters that might affect ethanol productivity have been reviewed (Lin and Tanaka, 2006). The process of bioethanol production composed of the steps of growing and harvesting the microorganisms at their log phase, starch liquefaction or saccharification and fermentation processes (Banerjee *et al*., 1988).

Fermentation is carried out in an anaerobic environment by microorganisms that can be bacteria and/ or fungi to breaking down sugars first and then use yeasts as most common species to carry out the fermentation process (Benerji *et al*., 2010; Brethauer, and Wyman, 2010; Alegre *et al*., 2003). To optimize the condition to digest cellulosic materials and starch, more selective fungal species have been recommended to first test for their high potential producing active extracellular enzymes in catalyst of cellulosic materials as well as the starch to less complex sugar moieties. The parameter of product in the fermentation medium have been showed to reduce the *Saccharomyces cerivisae* production of ethanol (Al-Judaibi, 2011). In this study, it was an example of the comparison of the application of common microorganisms residing on the surface of two types of waste of biomaterials; durian peel and jackfruit rinds and pulp in digestive ability of fiber structures in

saccharification process. Finally, at the last step of ethyl alcohol production with a selective high resistant alcoholic yeast strain, the alcohol production at short period of fermentation was estimated.

Materials and Methods

Common microorganisms and Sample Preparation

Either common microorganisms obtained from the surfaces of durian peels or jackfruit wastes were selected for the experiment. Approximately 20-30 kg of the biowastes of durian peels or jackfruit rinds, pulp and its surface were cut into small pieces approximately 2 X 2 cm^2 or even smaller pieces. They were soaking in sterile distilled water for at least 3-5 days and only the liquid was taken for the next saccharification step.

Lignocellulosic Digestion in Saccharification step

Both durian peels and jackfruit waste samples were boiled in distilled water for 30 min before pouring into sterile, dried bottles and then added 300 mL of common microorganisms (10^{10} cells/ mL) and adjust the volume of the fermentation to 1 liter with sterile distilled water and left at 25°C. The control sample was these two wastes without boiling in 1 liter of sterile water but adding the common microorganisms to observe the growth of microorganisms. The fermented liquid was taken for recording of total sugar, pH values, and color-texture of the starters during 30 day incubation.

Fermentation for Alcohol Production

At this second step done in batch fermentation bottle using the feeding culture of *S. cerevisiae* strain DistilaMax^{TM} RM, 493 EDV, Denmark, was grown to the concentration of 1-10 X 10^{12} cells/ ml before inoculation. After the first step, the fermented samples were all filtered for only liquid and then transferred into a 20 liter bottles and adjust for the total sugar content to 22% Brix with cane molass and pH to 4.6 before inoculation with the active yeast culture. The fermentation bottles were later kept tightly seal at room temperature for 30 days and regularly recorded for alcohol, total sugar, pH values, and color-texture.

Culture Preparation for alcohol fermentation

The strain of *Saccharomyces cerevisiae* used in this work was commercial yeast, DistilaMax^{TM} RM 493 ED, Denmark isolated in a tropical region from cane molasses. It demonstrates high temperature tolerance and provides the desirable production of rum, aguardiente and rhum agricole. This yeast firstly maintained at 4°C on agar slants was regrown in the agar medium. The composition of the agar was yeast extract (3 g/ L), malt extract (3 g/ L), peptone (5 g/ L), glucose (10 g/ L) and agar (20 g/ L) at a pH of 4.5. The cultures were maintained by sub-culturing every 20 days and the test tubes were then incubated at 30°C for 36 h. The culture on agar slants was stored at 4°C before adding in a liquid medium. A liquid medium composed of 2 g/ L), soluble starch (Merck Co., Darmstadt, Germany) (2 g/ L), 0.20% $(NH4)_2SO_4$ (20 g/ L), KH_2PO_4 (10 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ 5 g/L and yeast extract (10 g/L) at pH 5.0 was used for growth using ***2%*** (v/v) inoculum in 50 mL of the sterile medium contained in a 250-mL Erlenmeyer flask, aerobically, in a rotary shaker (120 rpm) at 30°C.

Alcohol and Total Sugar Determination

The amount of alcohol produced in cell-free fermentation broth was determined by alcohol dehydrogenase (obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (Banerjee *et al*., 1988). Total reducing sugars were determined by the Benedict's test (R.D. Simoni *et al*., 2002).

Results and Discussion

At the first step, both samples showed the variations of microbial community after reactivated and well prepared and tested for their highly activity in fiber digestion. For 25- 30 days of the cellulose digestion from durian peels, there were many varieties of microbial species observed than jackfruit wastes. Large amount of sugar content were obtained from both these cellulosic and high starch materials during the fermentation process. Not only natural habituating microorganisms on the waste itself but the isolated active strains could also be successfully achieved in 25-30 days for the digestion (8-10 % Brix). There was no significant difference between these two materials in terms of digestion speed and the ability to digest cellulose and starch to sugar if the inoculums added were firstly activated at 10^9-10^{12} cells/ ml of the culture (unpublished data).

At this first step, most microorganisms in durian samples as shown in table I were white fungi (*Aspergillus* spp,) more than bacteria (rod bacilli and cocci) and yeast. Whereas most microorganisms in jackfruit wastes were bacteria (rod and cocci) and black fungi (*Aspergillus niger*). These common microorganisms could convert xylose to ethanol by cellulase enzyme utilized in the hydrolysis of lignocellulosic materials from These different microbial communities could affect the values of total sugar contents because of higher sugar contents from the digested durian peels than that of the jack fruit wastes (12-14 Brixs of sugar contents, 40-60% w/w of waste, in approximately 20 days and 30-35 days, respectively).

Table 1: The observation of common microorganism growth at the first step of (A) durian peel or (B) jackfruit wastes (rind, surface, and pulp) digestion that were counted under microscopy.

Incubation (days)	Types of the microorganisms observed		
	Fungi	Bacteria	Yeasts
0	nd	F	nd
1	nd	F	nd
5	nd	Md	nd
7	F	Md	F
10	F	Md	F
12	M	Md	M
14	M	Md	M
16	H	H	H
18	H	H	H
20	Md	H	Md
22	Md	H	Md
24	Md	H	Md
26	F	H	F
30	F	H	F
32	F	H	F

(A)

Incubation (days)	Types of the microorganisms observed		
	Fungi	Bacteria	Yeasts
0	nd	F	F
1	nd	F	F
5	F	Md	F
7	F	Md	Md
10	Md	M	M
12	Md	M	M
14	M	H	H
16	H	H	Md
18	H	H	Md
20	H	Md	Md
22	H	Md	F
24	H	Md	F
26	H	Md	F
30	H	Md	F
32	H	Md	F

(B)

nd= not detectable, F = Few numbers of the microbes (< 10^4 cells/ mL), Md = medium numbers of the microbes (1-10 X 10^8 cells/ mL), H = high numbers of the microbes (1-300 X 10^{10} cells/ mL).

We found that after 30 days, these common microorganisms were not suitable for alcohol production since only 5-6 % alcohol production could be obtained if the fermentation was kept longer (unpublished data). Much longer incubation time was performed but even less numbers of these microbes were detected (from 10^8 cells/ml to 10^3 cells/ml. It was possible that these microorganisms could not stand high concentration of alcohol. As known that ethanol produced is toxic to many competing microorganisms including bacteria. Therefore, the inoculums have to be controlling with a large charge of strong yeast to overwhelm any competing organisms that may be introduced.

Then, the second step, all solid waste was removed out and the liquid with high contents of total sugar (approximately 7-12% Brix sugar) was adjusted with either cane molass or sucrose to obtain 22% Brix sugar. After inoculation of *S. cerevisiae* strain DistilaMax^{TM} RM, 493 EDV, from Fig. 1 and Fig 2, ethanol production was initially observed in only 5-8 days of incubation in both material samples. High alcohol concentration (13-16% (v/v)) could be observed in ten to 15 days and then be further distilled for the alcohol. From total 20 liters of fermented liquid, 2.5 liters of 95-97% pure ethanol could be obtained. In this study, same as the report done by Alshiyab *et al*. (2009), the use of big size 20 liter size of the fermentation tank could reduce the effect of gaseous products in fermentation medium and this enhanced biomass concentration.

In durian waste sample, the starch and sugar moieties could possibly be a bit better retrieved for alcohol production than those of jack fruit (60 and 55% w/w of wastes, respectively). These could possibly be due to less complex constitution of cellulose connecting with the starch nearby in durian peels than that of jack fruit rind and pulp wastes. Therefore, this durian waste was better biomass source for bacterial fermentation since it showed saturated 10-15% w/w of ethanol contents about 15 days whereas 25 days in jackfruit waste sample.

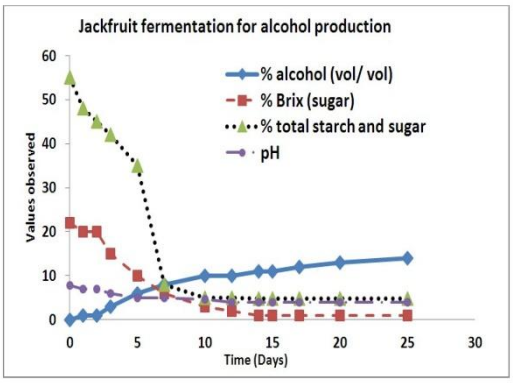

Figure 1. The result of durian peel fermentation for alcohol production during 30 day inculbation. The sample was inoculated with *S. cerevisiae* DistilaMax^{TM} RM, 493 EDV. The initial total reducing sugar (cane molass) concentration was of 22% Brix

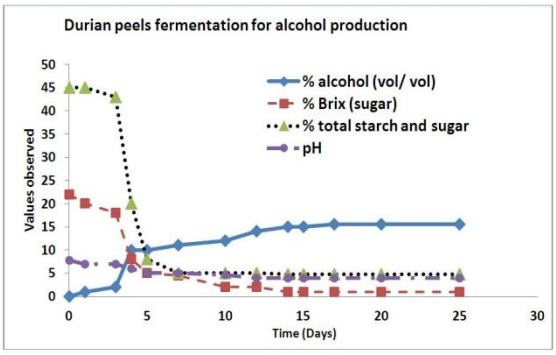

Figure 2. The result of durian peel fermentation for alcohol production during 30 day inculbation. The sample was inoculated with *S. cerevisiae* DistilaMax^{TM} RM, 493 EDV. The initial total reducing sugar (cane molass) concentration was of 22% Brix

So from these two figures, the present investigation has demonstrated the importance of fermentation parameters that can help improve the alcoholic fermentation. These factors are the total sugar contents that should be fast decreased to indicate high alcohol production together with the constant low pH and yeast strain. This alcohol fermentation experiment showed such a manageable typical batch of the microorganisms passed 4 stages that took nearly 30 day incubation for their growth. The suitable yeast strains had affected the fast alcohol production as well as the waste sample types, for example, in durian samples when using commercial yeasts, the concentration of the alcohol could be up to

14-16% in 15 days but the isolated species was to 12-14% in 20 days. Numbers of isolated yeast were reduced (from 10^{10} to 10^{6-7} cells/mL). In the test, a number of isolated yeast strain in our laboratory could not well resist alcohol at high concentration as well as the commercial yeast can (unpublished data), however, finally they could provide high alcohol production (14-15%) even but needed longer time.

Conclusions

This work provided a practical example of the current status of ethanol fermentation using various biomass resources. In the fermentation, all the processes were carried out in an anaerobic (no oxygen) environment by natural microorganism communities that grow and thrive the cellulosic materials as well as starch. These microorganism communities were fluctuated in numbers of fungi, bacteria, and yeasts that have to be assorted in certain function for high sugar production. Whereas at the alcohol fermentation process, a good strong yeast strain was essential in high alcohol production. Any biomaterial wastes could comparably be good sources for ethanol production if all essential parameters such as sugar contents, microorganisms and yeast strains, and pH were considerably optimized.

Acknowledgments

I am gratefully acknowledging the financial support of the National Research Council of Thailand (NRCT).

References

[1] Al-Judaibi, A. A. (2011). Effect of Some Fermentation Parameters on Ethanol Production from Beet Molasses by *Saccharomyces cerevisiae* CAIM13. American Journal of Agricultural and Biological Science. 6: 301-306.

[2] A. Aristidou, and M. Penttila,.(2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. Current in Opinion Biotechnology. 11: 187–198.

[3] Benerji, D. S. N., Rajini, K., Srinivasa Rao, B., Banerjee, D. R. N., Swaroopa Rani, K., Rsjkumar, G. et al. (2010). Studies on physicochemical and nutritional parameters for the production of ethanol from mahua flower (*Madhuca indica*) using *S.cerevisiae*-3090 through submerged fermentation (SMF). Journal of Microbial and Biochemical Technology. 2: 46-50.

[4] Alshiyab, H. S., Kalil, M. S., Hamid, A. A. and Yusoff, W.W. (2009). Improvement of biohydrogen production under increased the reactor size by *C.acetobutylicum* NCIMB 13357. American Journal of Environmental Sciences. 5: 33-40.

[5] Banerjee, M., Debnath, S. and Majumdar, S. K. (1988). Production of alcohol from starch by direct fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 32: 831-834.

[6] Simoni, R. D., Hill, R. L. and Vaughan, M. (2002). Benedict's Solution, a Reagent for Measuring Reducing Sugars: the Clinical Chemistry of Stanley R. Benedict. The Journal of Biological Chemistry. 277: 10 - 11.

[7] Alegre, R. M., Rigo, M. and Joekes, I. (2003). Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 751-757.

[8] Brethauer, S. and Wyman, C.E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation forcellulosic ethanol production. Bioresource Technology. 101**:** 4862-4874.

[9] Lin, Y. and Tanaka, S. (2006). Mini-Review: Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology. 69: 627-642.