ผลของสารสกัดหยาบจากอบเชยและส้มแขกต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

Inhibitory Effects of Cinnamon and Garcinia Crude Extracts on Alpha-amylase, Lipase, Trypsin and Alcohol Dehydrogenase

อัจฉรา แสงจันทร์, อัจฉรา บุตรดี และ สลิล ชั้นโรจน์*

Adchara Sangchan, Autchara Bootdee and Salil Chanroj*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biotechnology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 5 July 2016

Accepted : 29 November 2016

Published online : 6 December 2016

บทคัดย่อ

โรคอ้วนเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคแทรกซ้อน เช่น โรคเบาหวาน ทางเลือกหนึ่งในการควบคุมน้ำหนักคือการลดปริมาณน้ำตาลและกรดไขมันที่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากอบเชย (Cinnamon) และส้มแขก (Garcinia) ต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส และทริปซิน และเอนไซม์ในระบบเผาผลาญแอลกอฮอล์ ได้แก่ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยนำอบเชยและส้มแขกมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และเอทิลอะซิเตท ที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากอบเชยสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และทริปซินได้โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 และ 67.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากส้มแขกสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอบเชยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและทริปซิน ในขณะที่ส้มแขกมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

คำสำคัญ: การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส อบเชย ส้มแขก

*Corresponding author. E-mail : salil@buu.ac.th

Abstract

Obesity is a risk factor exacerbating metabolic disorders such as diabetes. To reduce a risk, one can control the weight by lowering an availability of glucose and fatty acid in digestive system. This research aimed to study the effects of cinnamon and garcinia crude extracts on activities of 3 digestive enzymes, including alpha-amylase, lipase and trypsin and an enzyme in alcohol metabolism pathway, alcohol dehydrogenase. Dried cinnamon and garcinia were extracted with distilled water, 95% ethanol or ethyl acetate at room temperature (27±2°C) or at 60°C and evaluated their inhibitory properties on digestive enzyme activities. Results demonstrated that extracts from cinnamon significantly inhibited activities of both alpha-amylase and trypsin (IC_{50} < 10 and 67.76 µg/ml, respectively). Meanwhile, extracts from garcinia specifically inhibited an activity of alcohol dehydrogenase (IC_{50} 43.62 µg/ml). Taken together, these results suggested that cinnamon and garcinia contained bioactive agents capable of specifically inhibiting activities of alpha-amylase and trypsin and an activity of alcohol dehydrogenase, respectively.

Keywords: inhibitors of enzyme activity**,** digestive enzymes, alcohol dehydrogenase, cinnamon, garcinia

บทนำ

โรคอ้วนเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Roh & Jung, 2012) สาเหตุของการเกิดโรคอ้วนส่วนใหญ่มาจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม รวมถึงการดำเนินชีวิต เช่น การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันและแป้งมากเกินไป การออกกำลังกายที่ไม่เพียงพอ ซึ่งส่งผลต่อความสมดุลของพลังงานที่ได้รับกับพลังงานที่ใช้ (Wright & Aronne, 2012) อาหารที่รับประทานเข้าไปจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Alpha-amylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยแป้งเป็น มอลโตส และกลูโคส (Gupta *et al*., 2003) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์เป็น กรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) และกลีเซอรอล (Glycerol) และเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน โดยเอนไซม์ทริปซินจะตัดโปรตีนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน (Lysine) หรืออาร์จีนีน (Arginine) (Nelson & Cox, 2000) เป็นต้น โมเลกุลขนาดเล็กที่ได้จากการย่อยเหล่านี้จะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานหรือสะสมในเซลล์ต่อไป นอกจากกระบวนการข้างต้น ร่างกายสามารถได้รับพลังงานจากการเผาผลาญแอลกอฮอล์ โดยการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นอะซิตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) พร้อมกับการรีดิวซ์ NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide) เป็น $NADH_2$ (Pocker, 2001)

การรักษาโรคอ้วนมีหลายวิธี เช่น การออกกำลังกาย การควบคุมอาหาร และการรับประทานยาลดน้ำหนัก ซึ่งการรับประทานยาเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากใช้เวลาน้อย และสามารถลดน้ำหนักได้มากกว่าวิธีอื่น อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยาลดน้ำหนัก เช่น การเพิ่มอัตราการเผาผลาญ การออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง และการลดการดูดซึมไขมัน ส่งผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย เช่น นอนไม่หลับ ใจสั่น และปวดศีรษะ เป็นต้น (Grundlingh *et al*.;

Ioannides-Demos *et al*., 2011) ทางเลือกหนึ่งในการควบคุมน้ำหนักคือการลดปริมาณน้ำตาลและกรดไขมันที่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร โดยอาศัยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และไลเปส ด้วยอาหารสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร หรือเครื่องเทศ เนื่องจากอาหารสุขภาพเหล่านี้จะมีสารในกลุ่มพฤกษเคมี (Phytochemicals) เช่น โพลีฟีนอล (polyphenol) และ ฟลาโวนอยล์ (flavonoid) ที่อาจมีคุณสมบัติในการควบคุมน้ำหนักได้ จากการศึกษาพบว่าการรับประทานอบเชย (Cinnamon) สามารถช่วยลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Khan *et al.,* 2003) และกรดไฮดรอกซีซิตริก (Hydroxycitric acid; HCA) ที่สกัดได้จากส้มแขก (Garcinia) มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพี-ซิเตรทไลเอส (ATP citratelyase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนซิเตรท (Citrate) เป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) ซึ่งนำไปใช้ในการสร้างกรดไขมัน ดังนั้นสารสกัดจากส้มแขกจึงสามารถยับยั้งกระบวนการสร้างกรดไขมันในร่างกายได้ (Yamada *et al.,* 2007)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศ ได้แก่ อบเชย และส้มแขก ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหาร ได้แก่ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส และทริปซิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบเผาผลาญพลังงาน ได้แก่ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องเทศ

อบเชย (Cinnamon) ได้มาจาก ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี มีลักษณะทางกายภาพเป็นส่วนเปลือกตากแห้ง มีสีน้ำตาล และมีกลิ่นหอมฉุน และส้มแขก (Garcinia) ได้มาจาก อ. โคกโพธิ์ จ. ปัตตานี มีลักษณะทางกายภาพเป็นชิ้นบางตากแห้ง สีน้ำตาลเข้ม และมีกลิ่นเปรี้ยว โดยเครื่องเทศทั้งสองชนิดนี้ถูกเก็บบรรจุในถุงซิปล็อค และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องตามลักษณะการใช้งาน

การเตรียมสารสกัดหยาบ

ชั่งเปลือกอบเชยและส้มแขกแห้งที่บดละเอียด ปริมาณ 2 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ เอทานอล 95% และเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 20 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (สกัดเพียงครั้งเดียว) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,700xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไประเหยแห้งโดยใช้โถดูดความชื้นและปั๊มสุญญากาศ จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl Sulfoxide; DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 1, 3 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Zheng *et al*., 2010)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (ดัดแปลงจาก Xiao *et al*., 2006)

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จากตับอ่อนหมู (A3176, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (20 มิลลิโมลาร์, pH 6.9) ปริมาตร 3.6 มิลลิลิตร ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากอบเชยหรือส้มแขก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาตร 1.9 มิลลิลิตร และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (0.4 U) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำแป้งความเข้มข้น 0.35 กรัมต่อลิตร

ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายผสมดังกล่าวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 1, 3, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ และเติมสารละลายไอโอดีน 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) โดยใช้อะคาร์โบส (Acarbose; Glucobay, Indonesia) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control)

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Lewis & Liu, 2012)

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากตับอ่อนหมู (L3126, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย reagent A (ทริสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ pH 7.8 ปริมาตร 16.2 มิลลิลิตร เอนไซม์ไลเปส 10 มิลลิกรัม (50 U) โซเดียมดีออกซีโคเลต 72 มิลลิกรัม และ แคลเซียมคลอไรด์ 3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร) ปริมาตร 940 ไมโครลิตร และตัวอย่างสารสกัดหยาบจากอบเชยหรือส้มแขก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมพาราไนโตรฟีนิลพาร์มิเตท (Para-nitrophenelplamitate, p-NPP) เป็นสารตั้งต้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที โดยใช้ออริสแตท (Orlistat (Tetrahydrolipstatin), Xenical, Switzerland) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (ดัดแปลงจาก Bergmeyer *et al*.,1974)

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน จากตับอ่อนหมู (T7168, Sigma-Aldrich, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 7.6 ปริมาตร 390 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ทริปซิน (เอนไซม์ทริปซิน 1 มิลลิกรัม (20 U) และแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารสกัดหยาบจากอบเชยหรือส้มแขก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอ็นเบนโซอิลอาร์จีนีนพาราไนโตรอะนีลีน (N-Benzoyl-D,L-Arginin-p-nitroanilid, BAPNA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 นาที โดยใช้ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟูลโอไรด์ (Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF); AppliChem, Germany) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ดัดแปลงจาก Taber, 1998)

ทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากยีสต์ (Sigma-Aldrich, A7011, USA) โดยใช้สารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย reagent A (โซเดียมไพโรฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร, β-NAD 3.75 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเอทานอล 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Reagent B (สารสกัดหยาบจากอบเชยหรือส้มแขก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตร 850 ไมโครลิตร) ปริมาตร 95 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (1.5 U) นำไปวัดค่าการ

ดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่าที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 วินาที โดยใช้กรดนิโคตินิค (Nicotinic acid; Gruppo montedison, Italy) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

การคำนวณ

ฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส สามารถคำนวณได้จากสมการด้านล่าง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Vi_{control} - Vi_{sample}}{(Vi_{control})} \times 100 \quad (1)$$

โดย % inhibition คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คำนวณได้จากผลต่างของอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ไม่มีสารสกัด ($Vi_{control}$) และอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีสารสกัด (Vi_{sample}) โดยอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หาได้จากค่าเฉลี่ยของความชันที่ได้จากข้อมูลอย่างน้อย 5 จุด และเป็นเส้นตรงโดยมีค่า R^2 มากกว่า 0.95 จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) หรือค่าความเข้มข้นที่สารสกัดนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 50 ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel ED50 plus v.1 (Apostolidis *et al*., 2006)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชยหรือส้มแขก ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ผลที่ได้จะถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยวิธี One Way ANOVA ร่วมกับการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากอบเชยต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และทริปซิน

อะคาร์โบสเป็นยารักษาโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (Glycoside hydrolase) ในลำไส้เล็กส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง งานวิจัยนี้จึงใช้อะคาร์โบสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดยพบว่าอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ร้อยละ 77.06, 86.32 และ 92.90 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Musa *et al*. (2012) ที่รายงานว่าอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 6.90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ร้อยละ 50 จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบพบว่าสารสกัดน้ำจากอบเชยที่อุณหภูมิห้องไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส แสดงให้เห็นว่าการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Spigno *et al*. (2007) ที่สามารถสกัดสารในกลุ่มฟีนอลในกากองุ่นได้มากขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับที่ 45 องศาเซลเซียส สารสกัดน้ำจากอบเชยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทั้ง 2 อุณหภูมิ และอบเชยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตท อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ร้อยละ 52.86 ถึง 72.32

ในขณะที่สารสกัดน้ำจากอบเชยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท ทั้ง 2 อุณหภูมิ ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ร้อยละ 67.15 ถึง 81.24 และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ร้อยละ 77.71 ถึง 88.65 และมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการบริโภคอบเชยในปริมาณมากอาจส่งผลให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ตามลำดับ (Khan *et al*., 2003) ทั้งนี้สารสกัดน้ำอบเชยมีความเป็นพิษต่ำ และความเข้มข้นที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน คือ 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก (Ahmad *et al*., 2015)

ตารางที่ 1 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และทริปซิน โดยสารสกัดหยาบจากอบเชย ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอนไซม์ (ตัวควบคุมเชิงบวก)	**ตัวทำละลายที่ใช้สกัด**	**อุณหภูมิที่ใช้สกัด (°C)**	**% การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์**	IC_{50} (µg/ml)
แอลฟา-อะไมเลส	น้ำ	ห้อง	38.09±0.16***	>100
		60	85.42±2.66	<10
	เอทานอล	ห้อง	88.62±3.29	<10
		60	81.41±2.62*	<10
	เอทิลอะซิเตท	ห้อง	82.96±1.38	<10
		60	77.71±2.51**	<10
(อะคาร์โบส)	-	-	92.90±0.10	<10
ทริปซิน	น้ำ	ห้อง	79.15±1.17**	68.95
		60	84.82±0.65*	67.76
	เอทานอล	ห้อง	51.47±8.16***	92.17
		60	62.66±3.73***	83.16
	เอทิลอะซิเตท	ห้อง	61.56±7.47***	87.40
		60	59.38±3.65***	>100
(PMSF)	-	-	99.53±0.79	14.81

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงคือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยสารสกัดหยาบจากอบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน (* , ** และ *** แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า $p < 0.05$, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

นอกจากสารสกัดหยาบจากอบเชยสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสยังมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินอีกด้วย ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชยต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินมีฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (PMSF) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก โดย PMSF จะเข้าไปสร้างพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ทริปซินทำให้

เอนไซม์ทริปซินทำงานไม่ได้ โดยพบว่า PMSF ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินได้ร้อยละ 35.75, 73.38 และ 99.53 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.81 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัดหยาบจากอบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ทั้ง 2 อุณหภูมิ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินได้ โดยสารสกัดน้ำจากอบเชยที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินได้ดีที่สุดคือ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 68.95 และ 67.76 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า IC_{50} เท่ากับ 92.17 และ 83.16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และอบเชยที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่อุณหภูมิห้อง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 87.40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอบเชยที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินดีเป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วมาก และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (อุณหภูมิห้องและที่ 60 องศาเซลเซียส) ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเล็กน้อย ยกเว้นการใช้เอทานอลสกัดที่ให้ค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการรับประทานอบเชยอาจจะช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ แต่อบเชยอาจลดคุณค่าทางโภชนาการของอาหารได้เช่นกัน ทำให้ร่างกายได้รับประโยชน์จากอาหารที่รับประทานเข้าไปไม่เต็มที่เนื่องจากอบเชยมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ทำให้โปรตีนถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนได้น้อยลง และร่างกายดูดซึมกรดอะมิโนได้น้อยลงตามลำดับ

ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากส้มแขกต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

งานวิจัยนี้ใช้กรดนิโคตินิคเป็นตัวควบคุมเชิงบวก เนื่องจากมีการรายงานว่ากรดนิโคตินิคสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในหนูได้ (Baker *et al*.,1973) เมื่อทำการวิจัยพบว่ากรดนิโคตินิคที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ร้อยละ 62.97, 83.81 และ 100 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพบว่าสารสกัดหยาบจากส้มแขกที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งสารสกัดจากส้มแขกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ร้อยละ 98 ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าสารสกัดหยาบจากส้มแขกมีสารอัลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายสารตั้งต้นนิโคตินาไมด์อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (NAD) จึงเข้าไปแย่งจับบริเวณเร่งของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ส่งผลให้การเกิดปฏิกิริยาลดลงหรือไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อไปได้ (Baker *et al*.,1973) โดยสารสกัดน้ำจากส้มแขกที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า IC_{50} เท่ากับ 47.84 และ 59.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเอทานอลจากส้มแขกที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.02 และ 57.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และส้มแขกที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.62 และ 51.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อุณหภูมิในการสกัดส้มแขกมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสลดลง คาดว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส อาจสลายไปเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามสารสกัดจากส้มแขกอาจนำมาใช้เป็นยาแก้เมาได้ โดยปกติแอลกอฮอล์เมื่อถูกดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือดจะถูกกำจัดออกที่ตับด้วยเอนไซม์

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งจะเปลี่ยนเอทานอลไปอยู่ในรูปของอะซีตัลดีไฮด์ และการสะสมของอะซีตัลดีไฮด์ในกระแสเลือดเป็นสาเหตุหลักของอาการเมา (Crabb *et al*., 2004 และ Eriksson, 2001) ยาแก้เมาที่ใช้ในปัจจุบันนั้นคือ 4-methylpyrazole ซึ่งยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ส่งผลให้ลดการสะสมของอะซีตัลดีไฮด์ในกระแสเลือด โดยมีการศึกษาพบว่า 4-methylpyrazole สามารถบรรเทาอาการความเป็นพิษเฉียบพลันของอะซีตัลดีไฮด์ในคนที่แพ้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้ (Inoue *et al*.,1985) นอกจากนี้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการให้กรดนิโคตินิคในหนูที่ได้รับเอทานอล 0.6 กรัมต่อกิโลกรัม มีการสะสมไขมันลดลง แต่ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดเพิ่มขึ้น (Baker *et al*.,1973) ทั้งนี้ในปัจจุบันมีเครื่องดื่มหลายชนิดที่มีส่วนผสมของสมุนไพรจีน ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Li *et al*., 2014) ทั้งนี้สารสกัดจากส้มแขกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเพียงเล็กน้อย คือได้ร้อยละ 9.64 ถึง 35.23 (ตารางที่ 2) ดังนั้นส้มแขกอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยอาศัยฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์เอทีพี-ซิเตรทไลเอส (Yamada *et al.,* 2007) จากการรวบรวมข้อมูลพบว่าการบริโภคสารสกัดจากส้มแขกในช่วง 1500-4667 มิลลิกรัมต่อวันนั้นปลอดภัยและไม่ส่งผลเสียต่อสุขภาพ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากส้มแขกมีความเป็นพิษต่ำ และสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพได้ (Chuah *et al*., 2012)

ตารางที่ 2 การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยสารสกัดหยาบจากส้มแขกที่ความเข้มข้น 100ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอนไซม์ (ตัวควบคุมเชิงบวก)	**ตัวทำละลายที่ใช้สกัด**	**อุณหภูมิที่ใช้สกัด (°C)**	**% การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์**	IC_{50} (µg/ml)
แอลฟา-อะไมเลส	น้ำ	ห้อง	26.20±3.25*	>100
		60	26.04±4.35*	>100
	เอทานอล	ห้อง	16.10±7.96*	>100
		60	9.64±2.51*	>100
	เอทิลอะซิเตท	ห้อง	35.23±7.04*	>100
		60	11.64±2.37*	>100
(อะคาร์โบส)	-	-	92.90±0.10	<10
แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	น้ำ	ห้อง	99.39±0.66	47.84
		60	97.55±0.34	59.60
	เอทานอล	ห้อง	99.28±0.56	50.02
		60	99.84±0.12	57.12
	เอทิลอะซิเตท	ห้อง	99.60±0.04	43.62
		60	99.65±0.20	51.05
(กรดนิโคตินิค)	-	-	100±0.00	<10

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงคือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยสารสกัดหยาบจากส้มแขกที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน (* แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

งานวิจัยนี้ใช้ออริสแตท ซึ่งเป็นยาบำบัดรักษาภาวะน้ำหนักตัวเกิน (โรคอ้วน) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่าออริสแตทที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 91.86, 97.04 และ 98.28 ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สอดคล้องกับ Kaewpiboon *et al*. (2012) ได้รายงานว่าออริสแตทมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดพบว่าสารสกัดหยาบจากอบเชยที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ทั้ง 2 อุณหภูมิ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพียงเล็กน้อยคือได้ร้อยละ 18.40 ถึง 27.62 ในขณะที่ส้มแขกที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 16.69 ถึง 21.13 ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่าอาจจะพบฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ดังเช่นผลการศึกษาของ Alias *et al*. (2014) ที่พบว่าสารสกัดจากส้มแขกความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (สกัดด้วย 80% เมทานอล) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้ร้อยละ 32.10 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ใช่กลไกหลักในการควบคุมน้ำหนักด้วยการบริโภคส้มแขกหรือสารสกัดจากส้มแขก

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากอบเชย และส้มแขกต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส พบว่าสารสกัดหยาบจากอบเชยสามารถยับยั้งกิจกรรมองเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากส้มแขก รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินได้ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากส้มแขกสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ดี ซึ่งผลวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคเบาหวานหรือสารควบคุมน้ำหนักต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 84/2559

เอกสารอ้างอิง

Ahmad, A.R., Nouri, H.S., Majid, F.A.A., Sarmidi, M.R., & Aziz, R.A. (2015). Assessment of Potential Toxicological Effects of Cinnamon Bark Aqueous Extract in Rats. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 5*, 36-44.

Alias,N., Leow T.C., Ali M.S.M., Tajudin A.A., Salleh A.B. & Rahman R.N.Z.R.A. (2014). Pancreatic Lipase Inhibitory Potential of Selected Malaysian Plants. *Proceeding of the 30th Annual Seminar of The Malaysian Natural Products Soceity Moving Translational Research In Natural Products Forward International Conference of Natural Products,* 151-154.

Apostolidis, E., Kwon, Y., & Shetty, K. (2006). Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension Management. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 15* (3), 433-441.

Baker, H., Luisada-Opper A., Sorrell, M.F., Thomson, A.D., & Frank, O. (1973). Inhibition by nicotinic acid of hepatic steatosis and alcohol dehydrogenase in ethanol-treated rats. *Experimental and Molecular Pathology, 19,* 106-112.

Bergmeyer, H. U., Gawehn, K., & Grassl, M. (1974). Trypsin. In Bergmeyer, H. U., (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. (pp. 515–516). New York: Academic Press.

Chuah, L.O., Yeap, S.K., Ho, W.Y., Beh, B.K., & Alitheen, N.B. (2012). In Vitro and In Vivo Toxicity of Garcinia or Hydroxycitric Acid: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* doi: 10.1155/2012/197920.

Crabb, D.W., Matsumoto, M., Chang, D., & You, M. (2004). Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceeding of the Nutrition Society, 63*, 49-63.

Eriksson, C. J. (2001). The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 25*, 15-32.

Grundlingh, J., Dargan, P., Zanfaly, M., & Wood, D. (2011). 2, 4-Dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *Journal of Medical Toxicology, 7*, 205-212.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V., & Chauhan, B. (2003). Microbial **α**- amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry, 38,* 1599-1616.

Inoue, K., Kera, Y., Kiriyama, T., & Komura, S. (1985). Suppression of acetaldehyde accumulation by 4-methylpyrazole in alcohol-hypersensitive. *Japanese Pharmacol, 38*, 43-48.

Ioannides-Demos, L., Piccenna, L., & McNeil, J. (2011). Pharmacotherapies for obesity: past, current, and future therapies. *Journal of Obesity*, doi: 10.1155/2011/179674.

Kaewpiboon, C., Lirdprapamongkol, K., Srisomsap, C., Winayanuwattikun, P., Yongvanich, T., Puwaprisirisan, P., Svasti, J., & Assavalapsakul, W. (2012). Studies of the in vitro cytotoxic, antioxidant, lipase inhibitory and antimicrobial activities of selected Thai medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 12*(217), 1-8.

Khan, A., Safdar, M., Khan, M.M.A., Khattak, K.N., & Anderson R.A. (2003). Cinnamon Improves Glucose and Lipids of People With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care, 26*, 3215-3218.

Lewis, D., & Liu, D. (2012). Direct Measurement of lipase inhibition by orlist at using a dissolution linked in vitro assay. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, doi:10.4172/2167-065X.1000103.

Li, S., Gan, L.Q., Li, S.K., Zheng, J.C., Xu, D.P., & Li, H.B. (2014). Effects of herbal infusions, tea and carbonated beverages on alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activity. *Food & Function, 5*, 42-49.

Musa, M.Y., Griffith, A.M., Michels, A.J., Schneider, E., & Frei, B. (2012). Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α-amylase and α-glucosidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 8924-8929.

Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*, 3rd (Ed.), New York: Worth Publishers.

Pocker, Y. (2001). Bioinorganic and bioorganic studies of liver alcohol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions, 130*(132), 383-393.

Roh, C., & Jung, U. (2012). Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *International Journal of Molecular Sciences, 13,* 1710-1719.

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering, 81*, 200-208.

Taber, R. (1998). The competitive inhibition of yeast alcohol dehydrogenase by 2, 2, 2 trifluoroethanol. *Biochemical Education, 26*, 239-242.

Wright, S., & Aronne, L. (2012). Causes of obesity. *Abdom Imaging, 37*, 730–732.

Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch–iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry, 351*(1), 146-148.

Yamada, T., Hida, H., & Yamada, Y. (2007). Chemistry, physiological properties, and microbial production of hydroxycitric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology. 75*(5), 977–982.

Zheng, C., Duan, Y., Gao, J., & Ruan, Z. (2010). Screening for anti-lipase properties of 37 traditional Chinese medicinal herbs. *Original Article, 73*(6), 319-324.