

DEVELOPMENT OF SIMPLE METHOD FOR DETECTION OF STEVIOL  
GLYCOSIDES CONTENT FROM STEVIA LEAF

SOMSIRI UDOMPAISARN 5337999 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: JAMORN SOMANA, Ph.D.,  
DUMRONGKIET ARTHAN, Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D.,  
LARAN T. JENSEN, Ph.D.

ABSTRACT

In this study, enzymatic assay of stevioside content in *Stevia* samples was developed. Recombinant *BT\_3567* gene was cloned from genomic DNA of anaerobic bacterium namely *Bacteroides thetaiotaomicron* HB-13 into pEt28a expression vector. Recombinant *BT\_3567* enzyme hydrolyses glucose moiety from stevioside at the position of C-13. Following with enzyme assay of glucose allowed stevioside quantitation. The steps of enzymatic stevioside determination are follows: 1) Incubate recombinant *BT\_3567* with *Stevia* sample in sodium acetate buffer, pH 6.0 at 37 °C for 10-20 min. 2) Stop reaction by heating at 80 °C for 5 min. 3) Measure glucose content using glucose oxidase and peroxidase assay. The molar amount of detected glucose was calculated as molar amount of stevioside presented in *Stevia* samples. Enzymatic assay developed in this study was validated and it exhibited high accuracy and precision as well as selectivity for stevioside determination in both of crude *Stevia* extract sample and the finished products of *Stevia*.

KEY WORDS: STEVIOSIDE DETECTION / METHOD DEVELOPMENT /  
RUBUSOSIDE /  $\beta$ -GLUCOSIDASE / ENZYMATIC METHOD

128 pages

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารหวาน จากต้นหญ้าหวานอย่างง่าย

DEVELOPMENT OF SIMPLE METHOD FOR DETECTION OF STEVIOL GLYCOSIDES  
CONTENT FROM STEVIA LEAF

สมศิริ อุคมไพศาล 5337999 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: จามร สมณะ, Ph.D., ดำรงเกียรติ อาจารย์, Ph.D., กิตติศักดิ์  
หยกทองวัฒนา, Ph.D., Laran T. Jensen, Ph.D.

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการพัฒนาวิธีการใช้เอนไซม์ ในการตรวจวัดปริมาณสติวิโอไซด์ในตัวอย่างหญ้าหวาน โดยเริ่มจากโคลนนิ่งยีนลูกผสมบีที3567 จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการหายใจที่มีชื่อเรียกว่า *Bacteroides thetaiotaomicron* HB-13 เข้าสู่พลาสมิดนำยีน pET28a เอนไซม์ลูกผสมบีที 3567 สลายโมเลกุลกลูโคสตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 13 ของสติวิโอไซด์ เมื่อทำการตรวจวัดกลูโคสหลังจากขั้นตอนนี้จะสามารถวัดปริมาณสติวิโอไซด์ที่เกิดขึ้นได้ วิธีการใช้เอนไซม์ในการตรวจวัดปริมาณสติวิโอไซด์มีขั้นตอนดังนี้ 1) บ่มเอนไซม์ลูกผสมบีที 3567 กับตัวอย่างหญ้าหวาน ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที 2) หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 3) วัดกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีการเอนไซม์ที่เรียกว่า กลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส จำนวนโมลของสติวิโอไซด์ที่วัดได้ในตัวอย่างหญ้าหวาน คำนวณได้จากจำนวนโมลของกลูโคสที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างนั้น วิธีการเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ถูกตรวจสอบแล้วว่ามีความถูกต้องและแม่นยำสูง รวมถึงมีความจำเพาะต่อการตรวจวัดปริมาณสติวิโอไซด์ทั้งในตัวอย่างสารสกัดหญ้าหวานและผลิตภัณฑ์หญ้าหวาน

128 หน้า