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

SOMSIRI UDOMPAISARN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2017

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

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 / β-GLUCOSIDASE / ENZYMATIC METHOD

Copyright by Mahidol University

128 pages

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารหวาน จากต้นหญ้าหวานอย่างง่าย

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

สมศิริ อุดมไพศาล 5337999 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

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

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการพัฒนาวิธีการใช้เอนไซม์ ในการตรวจวัดปริมาณสตีวิโอไซด์ในตัวอย่างหญ้าหวาน โดยเริ่มจากโคลนนิ่งยีนลูกผสมบีที3567 จากดีเอ็นเอของแบคทรีเรียกลุ่มที่ไม่อาศัยออกซิเจนในการหายใจที่มีชื่อเรียกว่า *Bacteroides thetaiotaomicron* HB-13 เข้าสู่พาหะนำยีน pET28a เอนไซม์ลูกผสมบีที 3567 สลายโมเลกุลกลูโคสตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 13 ของสตีวิโอไซด์ เมื่อทำการตรวจวัดกลูโคสหลังจากขั้นตอนนี้จะสามารถวัดปริมาณสตีวิโอไซด์ที่เกิดขึ้นได้ วิธีการใช้เอนไซม์ในการตรวจวัดปริมาณสตีวิโอไซด์มีขั้นตอนดังนี้ 1) บ่มเอนไซม์ลูกผสมบีที 3567 กับตัวอย่างหญ้าหวาน ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที 2) หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 3) วัดกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีการเอนไซม์ที่เรียกว่า กลูโคสออกซิเดสและเปอร์ออกซิเดส จำนวนโมลของสตีวิโอไซด์ที่วัดได้ในตัวอย่างหญ้าหวาน คำนวณได้จากจำนวนโมลของกลูโคสที่ตรวจวัดได้ในตัวอย่างนั้น วิธีการเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ถูกตรวจสอบแล้วว่ามีความถูกต้องและแม่นยำสูง รวมถึงมีความจำเพาะต่อการตรวจวัดปริมาณสตีวิโอไซด์ทั้งในตัวอย่างสารสกัดหญ้าหวานและผลิตภัณฑ์หญ้าหวาน

128 หน้า

Copyright by Mahidol University