

<b>Thesis Title</b>	Diversity of Yeasts in Honey and Their Production of Some Sugar Alcohols	
<b>Author</b>	Ms. Sujinan Saksinchai	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Chartchai Khanongnuch	Co-advisor

### ABSTRACT

Diversity of yeasts associated with bees and their food sources, including honey, has been explored during the last decade. In Thailand, however, there has been no identification of yeasts in honey and bees. In this study, we isolated a total of 186 yeast strains from 37 honey samples of 12 different bee species. On the basis of growth characteristics on yeast extract-malt extract (YM) and 50% glucose agars, 61 representative strains were chosen and identified by sequence analysis of the D1/D2 domains of large subunit rRNA gene (LSU rDNA D1/D2) and the internal transcribed spacer (ITS) regions. The data were compared with published sequences and the results showed the occurrence of 24 ascomycetous and 1 basidiomycetous yeast species belonging to 10 different genera. Sugar tolerant yeast species were commonly found in honey habitats.

Two strains of the *Zygoascus* clade and six strains of the *Zygosaccharomyces* clade were isolated from honeybees (*Apis cerana*, *A. dorsata* and *A. mellifera*) and stingless bees (*Homotrigona fimbriata* and *Tetragonula pagdeni*). These yeasts were unquestionably distinguished from their relatives by rDNA sequences and other taxonomic characteristics. Therefore, the novel anamorphic species in the *Zygoascus* clade, *Candida lundiana* sp. nov. and *Candida suthepensis* sp. nov., and a novel ascoporogenous yeast, *Zygosaccharomyces siamensis* sp. nov., are described in this study.

D-Xylose assimilation tests were performed for all yeast isolates. Forty strains utilized D-xylose as a carbon source, but only three strains, *Candida metapsilosis* HB7-1, *C. parapsilosis* HB15 and *Meyerozyma guilliermondii* HB45, produced xylitol in batch culture. *Candida metapsilosis* HB7-1 exhibited the highest xylitol yield, and therefore was chosen for evaluation of rare sugar alcohol production from various aldo-pentoses. *Candida metapsilosis* HB7-1 has also shown a potential to convert L-arabinose to L-arabitol. All xylose-assimilating yeasts were evaluated for their ability to produce rare sugar alcohols from various ketoses. Among them, *Debaryomyces hansenii* SB91 showed a potential to convert D-psicose to D-talitol. A higher conversion ratio was observed in the presence of xylitol, indicating that xylitol was a suitable enhancer for D-talitol production from D-psicose.

**Keywords:** Yeast Diversity, Raw Honey, *Candida lundiana* sp. nov., *Candida suthepensis* sp. nov., *Zygosaccharomyces siamensis* sp. nov., Rare Sugar Alcohols, Xylitol, L-Arabitol, D-Talitol

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำผึ้งและการผลิตน้ำตาล	
	แอลกอฮอล์บางชนิด	
ผู้เขียน	นางสาวสุจินันท์ ศักดิ์สินธุ์ชัย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร.สายสมร ถ้ายอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ.ดร.ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร.ชาติชาย โบนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการสำรวจความหลากหลายของยีสต์สัมพันธ์กับผึ้งและแหล่งอาหารของผึ้ง (รวมถึงน้ำผึ้ง) แต่ไม่เคยมีรายงานการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ในผึ้งและน้ำผึ้งของประเทศไทยมาก่อน ในการวิจัยได้แยกยีสต์ 186 สายพันธุ์จากผึ้ง 12 ชนิด จำนวน 37 รัง และคัดเลือกตัวแทนยีสต์ 61 สายพันธุ์บนพื้นฐานของลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง YM และ 50% กลูโคส มาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับของยีนส่วน LSU rDNA D1/D2 และ ITS เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับของยีนที่ตีพิมพ์แล้ว พบยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous 24 ชนิดและ basidiomycetous 1 ชนิด โดยยีสต์ทั้งหมดจัดอยู่ใน 10 สกุล ชุมชีพของยีสต์ที่พบในน้ำผึ้งเป็นยีสต์กลุ่มที่ทนน้ำตาล

จากการสำรวจยีสต์ในน้ำผึ้งดิบของประเทศไทย พบยีสต์ 2 สายพันธุ์ใน *Zygoascus* clade และ 6 สายพันธุ์ใน *Zygosaccharomyces* clade ซึ่งแยกได้จากผึ้ง (*Apis cerana*, *A. dorsata* และ *A. mellifera*) และชันโรง (*Homotrigona fimbriata* และ *Tetragonula pagdeni*) โดยจำแนกยีสต์เหล่านี้ ออกจากยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กันตามหลักของอนุกรมวิธานและลำดับของยีนส่วน rDNA ดังนั้นจึง

บรรยายลักษณะของยีสต์ชนิด anamorphic ใน *Zygoascus* clade (*Candida lundiana* sp. nov. และ *Candida suthepensis* sp. nov.) และยีสต์ชนิด ascoporogenous (*Zygosaccharomyces siamensis* sp. nov.) ไว้ในการศึกษาครั้งนี้

เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาทดสอบการใช้ D-xylose พบว่ามี 40 สายพันธุ์ที่ใช้ D-xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่มีเพียง 3 สายพันธุ์ (*Candida metapsilosis* HB7-1, *C. parapsilosis* HB15 และ *Meyerozyma guilliermondii* HB45) ที่ผลิต xylitol ในการเพาะเลี้ยงแบบเก็บเกี่ยวครั้งเดียว *C. metapsilosis* HB7-1 แสดงผลได้ของ xylitol สูงสุด ดังนั้นจึงนำยีสต์ชนิดนี้มาประเมินการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์หายากจาก aldo-pentoses และพบว่า *C. metapsilosis* HB7-1 แสดงศักยภาพในการเปลี่ยน L-arabinose ไปเป็น L-arabitol ด้วย เมื่อนำยีสต์ที่ใช้ D-xylose มาประเมินการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์หายากจาก ketoses พบว่า *Debaryomyces hansenii* SB91 แสดงศักยภาพในการเปลี่ยน D-psicose ไปเป็น D-talitol อัตราส่วนการเปลี่ยนน้ำตาลที่สูงขึ้นพบได้เมื่อมี xylitol ในอาหาร ซึ่งบ่งชี้ว่า xylitol เป็นตัวเพิ่มระดับการเปลี่ยนน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิต D-talitol จาก D-psicose

**Keywords:** ความหลากหลายของยีสต์, น้ำผึ้งดิบ, *Candida lundiana* sp. nov., *Candida suthepensis* sp. nov., *Zygosaccharomyces siamensis* sp. nov., น้ำตาลแอลกอฮอล์หายาก, Xylitol, L-Arabitol, D-Talitol