

Редукція хромату та каротиносинтезувальна активність резистентних до селеніту мутантів дріжджів *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

Г. І. Нечай^{1,2}, Г. П. Кшемінська¹, Г. В. Колісник², М. Гжондка³, М. В. Гончар^{1,3}

¹Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, Україна, 79005

²Інститут біології тварин УААН
Вул. Стуса, 38, Львів, Україна, 79034

³Заміський факультет біотехнології, Жешувський університет
Вул. Соколовська, 26, 36-100 Кольбушова, Польща

nechai_g@ukr.net

Мета. Дріжджі *P. rhodozyma* є перспективними біопродуцентами, оскільки синтезують каротиноїдний пігмент астаксантин з високою антиоксидантною активністю. Мета роботи полягала у вивченні здатності резистентних до селеніту штамів редукувати сполуки хрому(VI) і в аналізі взаємозв'язку між рівнем синтезу каротиноїдів, стійкістю до селеніту та редукуючими властивостями щодо хромату. **Методи.** Дріжджі вирощували за стандартних для даного виду умов. Вміст залишкового хромату в культуральній рідині визначали колориметрично дифенілкарбазидним методом. Кількість каротиноїдів виявляли екстракцією пігментів органічними розчинниками із попередньо пермеабілізованих клітин. **Результати.** Виділені селеніт-резистентні мутанти дріжджів *P. rhodozyma* проявили різні комбінації фенотипів за стійкістю/чутливістю до хромату і селеніту та здатністю до редукції хромату. **Висновки.** Одержані результати дають підставу припустити, що шляхи детоксикації хромату і селеніту у дріжджів *P. rhodozyma* є різними, хоча і здійснюються за однаковим редукційним типом. Мутантні штами можуть стати зручною моделлю для вивчення взаємозв'язку між гомеостазом оксидантів селену і хрому та біосинтезом каротиноїдів.

Ключові слова: хромат, редукція, селеніт, каротиноїди, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*).

Вступ. Сполуки шестивалентного хрому стали небезпечними забруднювачами довкілля завдяки широкому промислового використанню і сильно вираженим окисним властивостям. Хромати (CrO_4^{2-}) і біхромати ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) добре розчинні у воді, здатні проникати крізь біологічні мембрани. У мікроорганізмів, зокрема, у дріжджів, цей процес здійснюється за посередництвом транспортерів сульфату, продуктів генів *SUL1* і *SUL2* [1], на чому

ґрунтується селекція мутантів із порушеним транспортом сульфату за резистентністю до хромату [2]. Після проникнення в клітину сполуки Cr(VI) реагують із внутрішньоклітинними білками, нуклеїновими кислотами та іншими компонентами клітини, викликаючи мутагенні і канцерогенні ефекти [3, 4].

Живі клітини здатні до внутрішньоклітинного відновлення Cr(VI) до Cr(III). Цей процес є детоксикаційним, оскільки показано, що сполуки Cr(III) у 100 разів менш токсичні для бактерій і грибів порівняно зі сполуками Cr(VI). Внутрішньоклітин-

на редукція може здійснюватися неферментативними і ферментативними шляхами. Аскорбінова кислота, глутатіон, цистеїн ефективно редукують Cr(VI) до Cr(III) за фізіологічних умов. Механізми ензиматичної редукції хроматів є добре вивченими у бактерій і можуть функціонувати як за аеробних, так і за анаеробних умов. Так, наприклад, Cr(VI)-резистентні штами *Enterobacter cloacae* редукують хромати в анаеробних умовах, використовуючи Cr(VI) як акцептори електронів. У бактерій, які здійснюють аеробну хроматну редукцію (*Pseudomonas*, *Aeromonas* та ін.), цей процес каталізують NADH- і NADP(H)-залежні редуктази [5, 6].

В еукаріотних мікроорганізмів, зокрема дріжджів, достеменно не відомо, яка саме система редукції – ензиматична чи неензиматична або внутрішньо- чи зовнішньоклітинна – відіграє провідну роль у хромат-детоксикаційних процесах. До того ж немає жодних даних щодо здатності до детоксикації та біоремедіації хроматів такими перспективними в біотехнологічному плані дріжджами, як *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Астаксантину – основному каротиноїдному пігменту, який вони синтезують, притаманна сильна антиоксидантна активність, яка в 500 разів перевищує дію α -токоферолу та є найвищою серед відомих каротиноїдів [7–9]. Цей факт робить дріжджі *X. dendrorhous* перспективними для отримання фармакологічних препаратів для профілактики раку, посилення імунної відповіді, а також як протектори від дії вільних радикалів.

Водночас через суттєві відмінності у редокс-потенціалах астаксантину ($E^0 = 0,75$ В) і хромату ($E^0 = 1,33$ В) [10, 11] можна припустити підвищену активність каротиносинтезувальних дріжджів *X. dendrorhous* щодо редукції хромату. Для посилення редукційного детоксикаційного потенціалу астаксантинсинтезувальних дріжджів нами недавно проведено селекцію резистентних до селеніту мутантів дріжджів *P. rhodozyma* [12].

Метою цієї роботи було дослідження редукційних властивостей селеніт-резистентних штамів каротиносинтезувальних дріжджів *P. rhodozyma* щодо сполук хрому(VI) і аналіз взаємозв'язку між рівнем синтезу каротиноїдів, стійкістю до селеніту та здатністю до редукції хромату.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження слугували штами «дикого» типу дріжджів *X. dendrorhous* (*P. rhodozyma*) NRRL Y-10921 з колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України та отримані нами мутанти дріжджів *P. rhodozyma*, стійкі до селеніту натрію (штами *sit*).

Дріжджі вирощували на роторному шейкері при 250 об/хв, $t = 22$ С, в 100 мл колбах Ерленмейера, наповнених 10 мл середовища такого складу (г/л): $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,1$; дріжджовий екстракт – 2; сахароза – 20; біотин – $1 \cdot 10^{-6}$.

Селекцію спонтанних *sit*-мутантів *X. dendrorhous* здійснювали, відбираючи колонії дріжджів, які виростили на агаризованому середовищі за присутності 7,5 мМ Na_2SeO_3 .

В експериментах використано клітини в експоненційній фазі росту (перша доба). До суспензії клітин з концентрацією 0,5 мг/мл додавали стерильний розчин хромату калію та інкубували за $t = 22$ С і аерації. Біомасу визначали за оптичною густиною клітинної суспензії при довжині хвиль 540 нм з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин відповідно до калібрувального графіка.

Резистентність мутантних штамів дріжджів *P. rhodozyma* до селеніту натрію аналізували методом нанесення на агаризоване середовище з концентраціями селеніту від 1 до 30 мМ суспензії клітин (0,2 мг/мл) з подальшим вивченням росту кінетики після 2 діб вирощування за $t = 22$ С.

Вміст каротиноїдів визначали після пермеабілізації дріжджових клітин диметилсульфоксидом з наступною екстракцією каротиноїдів у суміші гексан–етилацетат [13]. Концентрацію залишкового хромату в культуральній рідині під час інкубації дріжджових клітин з хроматом виявляли колориметрично дифенілкарбазидним методом [6].

Повторюваність усіх дослідів – триразова.

Результати і обговорення. Існує багато літературних даних про здатність сульфат-редуючих клітин мікроорганізмів до редукції Cr(VI) [14]. Оскільки селенат і сульфат мають спільну систему редукції, яка є взаємоконкурентною [15, 16], то за аналогією можна припустити, що сполуки хрому і селену теж можуть мати спільні ензиматичні механізми редукції. На рис. 1 відображено результати

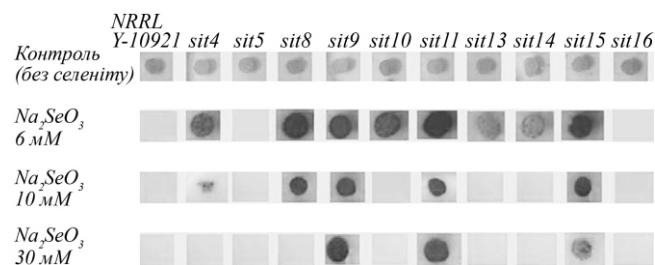


Рис. 1. Тест на резистентність до селеніту натрію клітин штаму «дикого» типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 і мутантних штамів *sit*

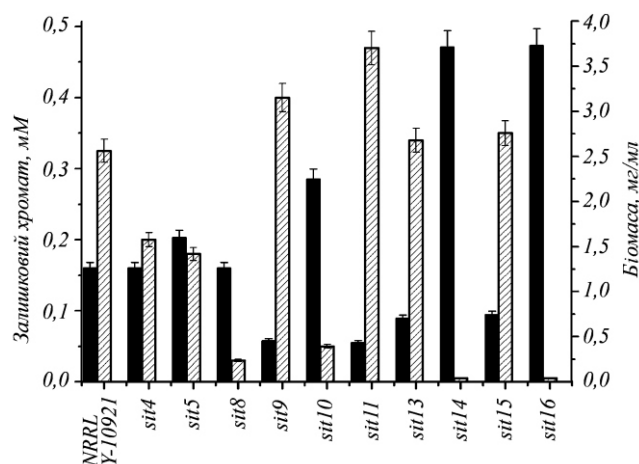


Рис. 2. Ріст і залишковий вміст хромату у позаклітинній рідині культур дріжджів *P. rhodozyma* на 4-ту добу інкубації клітин з 0,9 мМ хроматом: темні стовпчики – біомаса; світлі – Cr(VI)

тестування резистентності до селеніту у вихідного та похідних *sit*-мутантів *X. dendrorhous*, відібраних позитивною селекцією на середовищі з 7,5 мМ селенітом натрію.

Виявилось, що виділені мутантні штами дріжджів *P. rhodozyma* демонструють різні ступені стійкості до даного токсичного фактора. Штам «дикого» типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 уже не ріс при 6 мМ Na_2SeO_3 , тоді як шість *sit*-штамів з 10 активно росли за такої концентрації селеніту натрію. Навіть при п'ятиразовому підвищенні концентрації Na_2SeO_3 в агаризованому середовищі (30 мМ) все ще залишались три штами – *sit9*, *sit11* і *sit15*, ріст яких зберігався, причому перші два виявилися найрезистентнішими до селеніту.

Здатність селеніт-резистентних штамів каротиносинтезувальних дріжджів *X. dendrorhous* редукувати сполуки хрому(VI) вивчали, здійснюючи

моніторинг росту і вмісту залишкового хромату в культуральній рідині протягом 6 діб інкубації дріжджів (початкова концентрація – 0,5 мг/мл) з 0,9 мМ хромату. На рис. 2 представлено результати досліджу на 4-ту добу інкубації дріжджів.

Встановлено, що виділені мутанти з різним рівнем резистентності до селеніту виявляють різну толерантність до хромату як за здатністю росту в присутності хромату, так і за рівнем його редукації. Так, зокрема, два селеніт-резистентні штами *sit14* і *sit16* редукували весь хромат, і приріст біомаси у них був найбільшим – 5,40 і 5,36 мг/мл відповідно. Штами, у культурах яких залишалося від 3 до 22 % хромату (*sit4*, *sit5*, *sit8*), відзначалися інтенсивнішим ростом порівняно зі штамами, які відновлювали близько половини доданого хромату (*sit9*, *sit11*, *sit13*, *sit15*). Кореляційний аналіз даних ростової активності і залишкового вмісту хромату для тестованих штамів виявив чітку негативну кореляцію між цими параметрами ($R = -0,825$). Отже, як правило, штами, що ефективніше редукують хромат (нижчий рівень залишкового Cr(VI) у культуральній рідині), водночас краще ростуть за присутності Cr(VI).

Вивчення каротиносинтезувальної активності досліджених штамів *P. rhodozyma* виявило пригнічення цього процесу за присутності високих концентрацій хромату в інкубаційній суміші. Клітини залишалися безбарвними, доки концентрація хромату в середовищі не знижувалася приблизно до 0,2 мМ, після чого дріжджі починали активно рости і синтезувати каротиноїди. Отже, за пригнічення росту хромат водночас гальмує і процес синтезу каротиноїдів.

На рис. 3 зображено кінетику росту і процес редукації хромату для окремих *sit*-мутантів дріжджів. Штами *sit15* і *sit16* виявилися найактивнішими за ростом і редукацією хромату, до того ж хромат зникав із культуральної рідини найшвидше – за 4 доби інкубації, тоді як для штамів *sit9* і *sit11* концентрація хромату за 6 діб інкубації знизилася лише наполовину і в кінці досліджу становила 0,4–0,5 мМ. До того ж штами *sit9* і *sit11* відзначалися найповільнішим ростом. У решти мутантів інтенсифікація росту збігалася із зниженням хромату в культуральній рідині, і штами *sit8* і *sit13* відновлю-

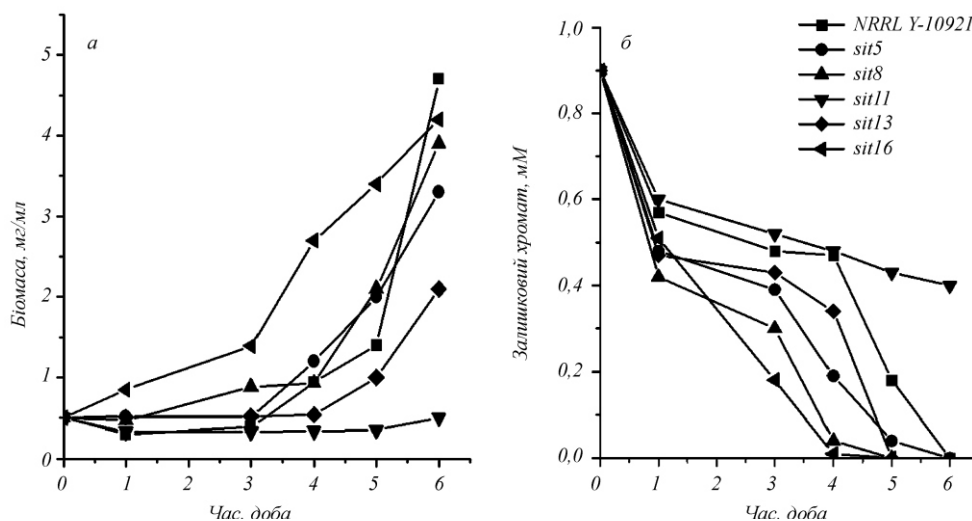


Рис. 3. Кінетика росту (а) і редукції хромату (б) для «дикого» штаму дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 і мутантів, резистентних до селеніту: 1 – NRRL Y-10921; 2 – *sit5*; 3 – *sit8*; 4 – *sit11*; 5 – *sit13*; 6 – *sit16*

вали весь хромат на 5-ту добу експерименту, а *sit5* та «дикий» штам – на 6-ту.

Отже, в результаті аналізу здатності до редукції хромату найстійкіших до селеніту мутантних штамів (*sit9*, *sit11*, *sit15*) показано, що хромат у концентрації 0,9 мМ суттєво пригнічує їхній ріст, до того ж вони значно гірше його редукують у порівнянні зі штамми *sit14*, *sit16*, які мають менше виражену стійкість до селеніту. Це може свідчити про відмінність у редукційних шляхах для цих двох аніонів. У наших попередніх роботах на моделі флавіногенних дріжджів *Pichia guilliermondii* [17] встановлено, що резистентні до селеніту мутанти відзначаються здатністю нагромаджувати у клітинах елементарний селен (Se^0), тоді як редукційна детоксикація хромату у цих дріжджів призводить до акумуляції в культуральній рідині біокомплексів Cr(III) [6, 18].

Таким чином, різна природа кінцевих продуктів редукції токсичних оксіаніонів хрому і селену та відмінність у їхній локалізації може спричинити неоднозначний взаємозв'язок між фенотипами резистентності до селеніту та хромату. Не виключено також можливості того, що підвищена здатність до редукційної детоксикації селеніту у селеніт-резистентних штамів *X. dendrorhous* призводить до підвищення пулу дуже токсичного радикалу Cr(V) – інтермедиату редукції Cr(VI). Цю гіпотезу ми плануємо перевірити, здійснюючи моніторинг генерації Cr(V) у культурах мутантів *sit* за допомогою ЕПР-спектроскопії, що зроблено нами раніше

для хромат-резистентних штамів флавіногенних дріжджів *P. guilliermondii* [20, 21].

Після 4 діб культивування дріжджів, коли рівень синтезу каротиноїдів максимальний [19], ми визначали загальний вміст каротиноїдів і приріст біомаси у штаму «дикого» типу і мутантів (рис. 4).

Переважна більшість резистентних до селеніту штамів синтезувала менше каротиноїдів, ніж вихідний штам, який продукував 327 мкг/г сухої біомаси, причому коефіцієнт зниження каротиносинтезувальної активності у мутантів коливався від 1,1 до 2,5 разу. Лише штам *sit16* продукував каротиноїди приблизно на такому ж рівні, як і «дикий» штам. При аналізі взаємозв'язку між резистентністю до селеніту натрію і вмістом каротиноїдів, які продукують досліджувані штами, виявилося, що найстійкіші до селеніту натрію мутанти *sit9*, *sit11*, *sit15* синтезують приблизно в два рази менше каротиноїдів порівняно з «диким» штамом. Це може свідчити про відсутність прямої кореляції між рівнем каротиногенезу та здатністю до детоксикації селеніту.

Проаналізувавши стійкість одержаних *sit*-мутантів дріжджів *P. rhodozyma* до селеніту (рис. 1) і зіставивши одержані результати з даними про їхню здатність до редукції хромату (рис. 2), ми поділили всі досліджені штами на три групи за фенотиповими характеристиками (таблиця).

Як виявилось, існують практично всі комбінації фенотипів за стійкістю/чутливістю до хромату і селеніту, що свідчить про відсутність однозначної за-

Фенотипові характеристики стійкості до селеніту і хрому sit-мутантів *P. rhodozyma*

Фенотипова група	Хромат	Селеніт	Штами дріжджів <i>P. rhodozyma</i>
I	Резистентний	Резистентний	<i>sit8, sit10</i>
II	Резистентний	Рівень контролю	<i>sit14, sit16</i>
III	Чутливий	Надрезистентний	<i>sit9, sit11, sit15</i>
IV	Чутливий	Рівень контролю	<i>sit4, sit5, sit13</i>

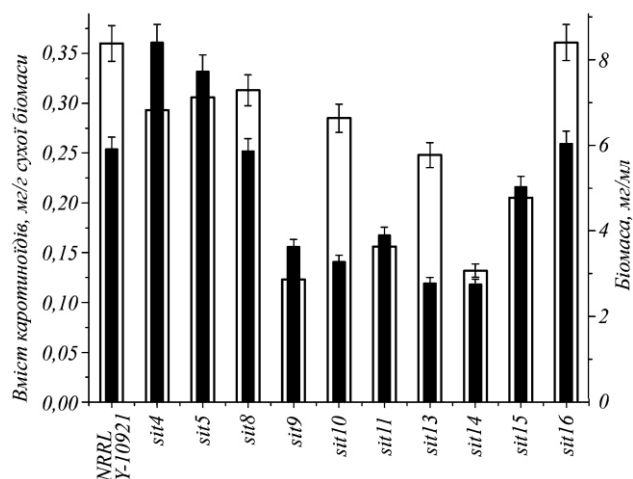


Рис. 4. Ріст і синтез каротиноїдів для штаму «дикого» типу дріжджів *P. rhodozyma* NRRL Y-10921 і мутантів, стійких до селеніту натрію, в середовищі без додавання останнього: темні стовпчики – каротиноїди; світлі – біомаса

лежності між резистентністю до оксіаніонів хрому і селену.

Висновки. Одержані результати дають підставу припустити, що шляхи детоксикації хрому і селеніту у дріжджів *P. rhodozyma* є різними, хоча ці процеси здійснюються за спільним редукційним типом. Відсутність простої залежності між резистентністю до хрому і селеніту та здатністю дріжджів до синтезу каротиноїдів свідчить про необхідність пошуку біохімічних і генетичних механізмів, відповідальних за ці процеси. Отримані мутанти з різною комбінацією фенотипів резистентності до оксіаніонів селену та хрому слугуватимуть зручною моделлю для вивчення взаємозв'язку між гомеостазом вказаних елементів та біосинтезом каротиноїдів із високою антиоксидантною активністю.

Автори статті висловлюють щире подяку Комітету наукових досліджень (Польща) за фінансову підтримку, яка надається в рамках польсько-українського гранту «Мутанти неконвенційних дріжд-

жів для ефективної біоремедіації хрому та очистки промислових водних стоків».

H. I. Nechay, H. P. Ksheminska, H. V. Kolisnyk, M. Grzadka, M. V. Gonchar

Reduction of chromate and carotene-synthesizing activity of selenite-resistant mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

Summary

Aim. The yeast *P. rhodozyma* is a perspective microbial producer of carotenoid pigment astaxanthin with a high antioxidant power. The aim of the work was to study the ability of the selenite-resistant strains of this yeast to reduce chrome(VI) compounds, as well as to analyze the relations between synthesis of carotenoids, resistance to selenite and chromate-reducing activity of *P. rhodozyma*. **Methods.** The yeast cells were grown at standard conditions for this species. The residual chromate content in cultural liquid was determined colorimetrically using diphenylcarbazide. The carotenoid content was determined after extraction of the pigments from the previously permeabilized cells by organic solvents. **Results.** The selected selenite-resistant mutants of the yeast *P. rhodozyma* revealed the different combinations of the phenotypes related with tolerance/sensitivity to chromate and selenite, as well as ability to reduce chromate. **Conclusions.** The obtained results give reasons for suggesting that pathways of detoxification of chromate and selenite by the yeast *P. rhodozyma* are different, although run through a common reductive type. The isolated mutant strains would be served as the useful models to study relations between homeostasis of Se and Cr oxyanions and biosynthesis of carotenes.

Keywords: chromate, reduction, selenite, carotenes, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*).

Г. І. Нечай, Г. П. Кшеминская, А. В. Колесник, М. Гжондка, М. В. Гончар

Редукция хромата и каротинсинтезирующая активность резистентных к селениту мутантов дрожжей *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)

Резюме

Введение. Дрожжи *P. rhodozyma* – перспективный биотехнологический продуцент, синтезирующий каротиноидный пигмент астаксантин с высоким антиоксидантным потенциалом. Цель работы состояла в изучении способности резистентных к селениту штаммов редуцировать соединения хро-

ма (VI) і в аналізі взаємозв'язку між рівнем синтезу каротиноїдів, стійкістю до селеніту та редуцуючими властивостями по відношенню до хрому. **Методи.** Клітки дріжджів вирощували в стандартних для цього виду умовах. Остаточне вміст хрому в культуральній рідині визначали колориметрично, використовуючи дифенілкарбазид. Вміст каротиноїдів визначали екстракцією пігментів сумішшю органічних розчинників з попередньо пермеабілізованих кліток. **Результати.** Виділені селеніт-резистентні мутанти дріжджів *P. rhodozyma* проявили різні комбінації фенотипів стійкості/чутливості до хрому та селеніту, а також здатність до редуцції хрому. **Висновки.** Отримані результати дають підставу вважати, що шляхи детоксикації хрому та селеніту у дріжджів *P. rhodozyma* різні, хоча здійснюються за загальною моделлю. Мутантні штами можуть стати зручною моделлю для вивчення взаємозв'язку між гомеостазом оксидантів селену та хрому та біосинтезом каротиноїдів.

Ключові слова: хромат, редуція, селеніт, каротиноїди, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*).

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cherest H., Davidian J., Thomas D., Benes V., Ansoerge W., Surdin-Kerjan V. Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*.–1997.–**145**, N 3.–P. 627–635.
2. Breton A., Surdin-Kerjan V. Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: biochemical and genetic study // *J. Bacteriol.*–1977.–**132**, N 1.–P. 224–232.
3. Camargo F. A. O., Bento F. M., Okeke B. C., Frankenberger W. T. Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate // *J. Environ. Qual.*–2003.–**32**, N 4.–P. 1228–1233.
4. Mabrouk M. E. M. Statistical optimization of medium components for chromate reduction by halophilic *Streptomyces* sp. MS-2 // *Afr. J. Microbiol. Res.*–2008.–**2**.–P. 103–109.
5. Baldi F., Vaghan A. M., Olson G. Chromium (VI)-resistant yeast isolated from a sewage treatment plant receiving tannery wastes // *Appl. Environ Microbiol.*–1990.–**56**, N 4.–P. 913–918.
6. Ksheminska H. P., Honchar T. M., Gayda G. Z., Gonchar M. V. Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures // *Cent. Eur. J. Biol.*–2006.–**1**, N 1.–P. 137–149.
7. Kaminska M., Solohub L. The carotenoproduced yeast *Phaffia rhodozyma* // *Visnyk of L'viv Univ., Biology Series.*–2004.–**37**.–P. 3–12.
8. Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications // *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*–2006.–**46**, N 2.–P. 185–196.
9. Verdoes J. C., Sandmann G., Visser H., Diaz M., Mossel M., Ooyen A. Metabolic engineering of the carotenoid biosyn-

thetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) // *Appl. Environ Microbiol.*–2003.–**69**, N 7.–P. 3728–3738.

10. Han R., Tian Y., Wu Y., Wang P., Ai X., Zhang J., Skibsted L. Mechanism of radical cation formation from the excited states of zeaxanthin and astaxanthin in chloroform // *Photochem. Photobiol.*–2006.–**82**, N 2.–P. 538–546.
11. Park D., Park J. M., Yun Y. S. Mechanisms of the removal of hexavalent chromium by biomaterials or biomaterial-based activated carbons // *J. Hazard. Mater.*–2006.–**137**, N 2.–P. 1254–1257.
12. Nechai H. Isolation spontaneous mutants of carotene-synthesizing yeast *Phaffia rhodozyma* which are resistant to sodium selenite // *Abstr. II Int. Conf. of Young Scientist «Biology: from molecular to biosphere»* (19–21 Nov. 2007, Kharkiv).–Kharkiv, 2007.–P. 386.
13. Sedmak J. J., Weerasinghe D. K., Jolly S. O. Extraction and quantitation of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* // *Bio-tech. Tech.*–1990.–**4**, N 2.–P. 107–112.
14. Rahman M. U., Gul S., Ul Haq M. Z. Reduction of chromium(VI) by locally isolated *Pseudomonas* sp. C-171 // *Turk. J. Biol.*–2007.–**31**.–P. 161–166.
15. Banzsky L., Simonics T., Maraz A. Sulphate metabolism of selenate-resistant mutants *Schizosaccharomyces pombe* // *J. Gen. Appl. Microbiol.*–2003.–**49**.–P. 271–278.
16. Birringer M., Pilawa S., Flohe L. Trends in selenium biochemistry // *Nat. Prod. Rep.*–2002.–**19**.–P. 693–718.
17. Chaban L., Pokrovetska O., Stenchuk M., Gonchar M. Isolation and physiological characterization of selenite-resistant mutants of the yeast *Pichia guilliermondii* // *Visnyk of L'viv Univ., Biology Series.*–2004.–**34**.–P. 92–99.
18. Ksheminska H., Fedorovich D., Honchar T., Ivash M., Gonchar M. Yeast tolerance to chromium depends on extra-cellular chromate reduction and Cr(III)-chelation // *Food Technol. Biotechnol.*–2008.–**46**, N 4.–P. 420–427.
19. Ni H., Chen Q., Ruan H., Yang Y., Li L., Wu G., Hu W., He G. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*–2007.–**8**, N 5.–P. 365–370.
20. Ksheminska H., Honchar T., Usatenko Yu., Gonchar M. Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures // *Abstr. II Polish-Ukrain. Weigl Conf. «Microbiology in the XXI century»* (24–26 Sept. 2007, Warsaw).–Warsaw, 2007.–P. 240.
21. Gayda G., Ksheminska H., Prokopiv T., Ivash M., Nechai G., Usatenko Y., Gonchar M. Extra-cellular reduction in chromate detoxification by daker's and non-conventional yeasts: Study of the mechanisms of Cr(III)-biochelates generation and their characterization // *Abstr. XII Int. Congr. on Yeasts* (11–15 Aug., 2008, Kyiv).–Kyiv, 2008.–P. 197.

УДК 579.222.7

Надійшла до редакції 16.01.09