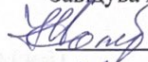


НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

«На правах рукопису»
УДК 575.112

До захисту допущено:
Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ
«02» грудня 2022 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Виявлення потенційних продуцентів біогенних магнітних
наночастинок серед мікрогрибів»

Виконала:

Студентка VI курсу, групи ББ-11мп
Білобловська Діана Олександрівна

Науковий керівник:

професор кафедри біоенергетики,
біоінформатики та екобіотехнології, д.т.н.
Горобець Світлана Василівна

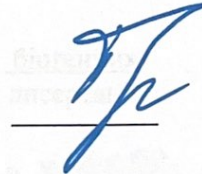
Консультант з розробки стартап проекту:

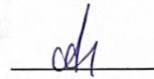
старший викладач, кандидат наук
Погребняк Анна Юріївна

Рецензент:

професор кафедри загальної фізики
та моделювання фізичних процесів, д.ф.-м.н.
Горобець Оксана Юріївна









Засвідчую, що у цій магістерській
дисертації немає запозичень з праць
інших авторів без відповідних посилань.
Студентка Білобловська Д.О.

Київ – 2022 року





- Проведення літературного пошуку щодо використання магнітотаксисних бактерій і мікрогрибів у біомедичній галузі та в галузі зеленого синтезу наночастинок.
- Визначення здатності до синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН) у виділених мікроорганізмів методами порівняльної геноміки.
- Розрахунок фізико-хімічних властивостей гомологів татм білків бактерій магнітотаксису в протеомах мікроміцетів за допомогою методів пакету Biopython мови програмування Python.
- Розробка стартап-проекту.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація

7. Орієнтовний перелік публікацій

1. Горобець С.В., Білобловська Д.О. Виявлення потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед мікрогрибів – Матеріали XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» 03.06.2022р. 120-122с.

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розроблення стартап проекту	Погребняк А.Ю., старший викладач, кандидат наук		

9. Дата видачі завдання

2022 р.

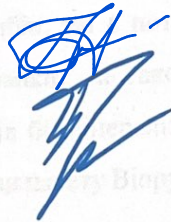
Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1.	Визначення предмету дослідження	14.02.22	виконано
2.	Характеристика об'єкту	14.02.22.	виконано
3.	Огляд літератури	01.05.22-01.10.22	виконано
4.	Визначення матеріалів і методів	01.09 - 10.09.22	виконано

5.	Виконання експериментальної частини	12.09 - 28.11.22	виконано
6.	Аналіз отриманих результатів	28.11.22 - 03.12.22	виконано
7.	Розроблення стартап проєкту	28.11.22.	виконано
8.	Оформлення дипломної роботи	01.12 - 13.12.22	виконано

Студент

Науковий керівник



Діана БІЛОБЛОВСЬКА

Світлана ГОРОБЕЦЬ

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 119 сторінок, 22 таблиці, 18 рисунків, 62 використаних джерела.

Актуальним є дослідження потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед представників мікрогрибів для подальшого промислового застосування.

Метою є виявлення мікрогрибів, які є потенційними продуцентами БМН методами порівняльної геноміки, а також здійснити розрахунок фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікрогрибів засобами пакету Biopython мови програмування Python.

Завданнями є проведення літературного пошуку щодо використання магнітотаксисних бактерій і мікрогрибів у біомедичній галузі та в галузі зеленого синтезу наночастинок. Подальше визначення здатності до синтезу біогенних магнітних наночастинок (БМН) у виділених мікроорганізмів методами порівняльної геноміки, а також розрахунок фізико-хімічних властивості гомологів *mat* білків бактерій магнітотаксису в протеомах мікроміцетів за допомогою методів пакету Biopython мови програмування Python.

Об'єктом дослідження є протеоми магнітотаксисних бактерій та мікроміцетів, білки біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікрогрибів.

Предмет дослідження – це фізико-хімічні властивості *mat*-білків магнітотаксисних бактерій та їх гомологів у мікроміцетів, генетичний механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок мікроміцетів.

Розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у відібраних магнітотаксисних бактеріях. Фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок із мікрогрибів також розраховано за допомогою

пакету Biopython мови програмування Python у досліджених мікроміцетах. Вперше виявлено відповідність фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок мікрогрибів та фізико-хімічних властивостей гомологічних там білків магнітотаксисних бактерій.

Результати було опубліковано у матеріалах XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» - Виявлення потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед мікрогрибів.

Ключові слова: біомінералізація, магнітотаксисні бактерії, зелений синтез, біомедицина, мікрогриби, наночастинок, магнітні наночастинок, біоінформатика.

ABSTRACT

The master's thesis contains 119 pages, 22 tables, 18 figures, 62 sources.

The study of indicative producers of biogenic magnetic nanoparticles among representatives of microfungi for further industrial application is relevant.

The method is to identify microfungi that are indicative producers of BMN by comparative genomics methods, as well as to calculate the physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles in microfungi using the Biopython language package of Python programming.

The tasks are conducting a literature search on the use of magnetotaxis bacteria and microfungi in the biomedical field and in the field of green synthesis of nanoparticles. Further determination of the ability to synthesize biogenic magnetic nanoparticles (BMN) in selected microorganisms by comparative genomics methods, as well as calculation of the physicochemical properties of homologues of bacterial magnetotaxis proteins in micromycete proteomes using the methods of the Biopython package of the Python programming language.

The object of research is the proteomes of magnetotaxis bacteria and micromycetes, proteins of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles in microfungi.

The subject of the study is the physicochemical properties of mother proteins of magnetotaxis bacteria and their homologues in micromycetes, the genetic mechanism of biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles of micromycetes.

Physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles in selected magnetotaxis bacteria were calculated. Physicochemical properties of proteins and biomineralization of biogenic magnetic nanoparticles from microfungi were also calculated using the Biopython package of the Python programming language in the studied micromycetes. For the first time, the correspondence between the physicochemical properties of biomineralization proteins of biogenic magnetic nanoparticles of microfungi and

the physicochemical properties of the homologous mother proteins of magnetotaxis bacteria was revealed.

The results were published in the materials of the 16th All-Ukrainian scientific and practical conference of students, postgraduates and young scientists "Biotechnology of the 21st century" - Identification of identified producers of biogenic magnetic nanoparticles among microfungi.

Key words: *biomineralization, magnetotaxis bacteria, green synthesis, biomedicine, microfungi, nanoparticles, magnetic nanoparticles, bioinformatics.*

Зміст

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ	9
Вступ.....	10
1. Загальний огляд літератури	13
1.1 Значення наночастинок у біотехнологічних процесах.....	13
1.2 Переваги магнітних наночастинок у біомедицині та біотехнології	16
1.3 Синтез біогенних магнітних наночастинок.....	17
1.4 Класифікація досліджуваних мікрогрибів.....	18
1.5 Синтез наночастинок мікрогрибами	25
2. Матеріали і методи досліджень	27
2.1 Біоінформаційний аналіз мікрогрибів, як потенційних продуцентів БМН.	27
2.2 Розрахунок фізико-хімічних властивостей білків методами BioPython.....	31
3. Результати і обговорення.....	36
3.1 Результати.....	36
3.1.2 Класифікація грибів за генетичним механізмом біомінералізації БМН	52
3.1.3 Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітотаксисних бактерій та мікрогрибів	53
3.2 Обговорення результатів.....	79
4. Стартап проєкт	84
4.1 Резюме: бізнес-ідея, мета стартапу, техніко- економічні показники.....	84
4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	86
4.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту.....	89
4.4 Визначення потенційних споживачів	92
4.5 Розрахунок ціни інноваційної пропозиції на ринку	95
4.6 Карта бізнес-процесів реалізації проєкту	102
4.7 Ризики стартап-проєкту та методи управління ними.....	105
5. Охорона праці та навколишнього середовища.....	109
Висновки	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	113

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

АКЗ – амінокислотні залишки;

БМН – біогенні магнітні наночастинки;

МН – магнітні наночастинки;

МО – магнітосомний острівець;

МТБ – магнітотаксисні бактерії;

НЧ – наночастинки;

ТЕМ – трансмісійний електронний мікроскоп;

BLAST – basic local alignment search tool;

CDF – покращувачі дифузію катіонів;

DOX – доксорубіцин;

GM – ганглезид;

NCBI – National Center for Biotechnology Information;

TPR – тетратрикопептидний повтор.

Вступ

Актуальність.

Дослідження потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед представників мікрогрибів є актуальним для промислового застосування. Глобальне потепління та зміна клімату спонукали світову громадськість до обізнаності та до зусиль щодо зменшення утворення небезпечних відходів. Таким чином, «зелена» хімія та хімічні процеси поступово інтегруються в науку та промисловість для сталого розвитку [1].

У наш час наночастинки (НЧ) викликають великий науковий інтерес завдяки характеристикам, що залежать від розміру та форми, завдяки чому вони використовуються в різноманітних сферах, починаючи від біосенсорів та каталізаторів до оптики, хімічних датчиків та комп'ютерних транзисторів, а також електронних, логічних схем і схем пам'яті [2].

Мета даної роботи – виявлення мікрогрибів, які є потенційними продуцентами БМН методами порівняльної геноміки, розрахунок фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН) у мікрогрибів, порівняння фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок (БМН) у мікрогрибів з відповідними властивостями mat-білків магнітотаксисних бактерій (МТБ).

Завдання для роботи над виявленням потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед мікрогрибів:

- провести аналіз літературних даних на предмет застосування представників мікрогрибів, що є потенційними продуцентами БМН, у зеленому синтезі наночастинок:
- дослідити методами порівняльної геноміки представників мікрогрибів на наявність генетичного механізму біомінералізації біогенних магнітних наночастинок;

- розрахувати фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікрогрибів;
- порівняти фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікрогрибів з відповідними властивостями mat-білків магнітотаксисних бактерій;
- розробити стартап проєкт.

Об'єкт дослідження:

Протеоми штамів мікроміцетів *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* NRRL1, *Aspergillus ruber* CBS 135680, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavus* NRRL3357, *Aspergillus fischeri* NRRL 181, *Aspergillus terreus* NIH2624, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus luchuensis* IFO 4308, *Aspergillus westerdijkiae*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma reesei* QM6a, *Trichoderma virens* Gv29-8, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma brevicompactum*, *Trichoderma arundinaceum*, *Penicillium roqueforti* FM164, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camemberti* FM 013, *Penicillium fuscoglaucum* FM041, *Penicillium carneum* LCP05634, *Penicillium paneum* FM227, *Penicillium biforme* FM169, *Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium digitatum* Pd1.

Предмет дослідження: фізико-хімічні властивості mat-білків мікрогрибів, генетичний механізм біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікроміцетів.

Наукова новизна:

Вперше на основі аналізу літературних даних показано, що в зеленому синтезі наночастинок використовуються мікроміцети, у яких виявлено генетичний механізм біомінералізації БМН та показано, що відсутні літературні дані про використання в зеленому синтезі наночастинок

мікроміцетів, у яких не виявлено генетичного механізму біомінералізації БМН. Вперше розраховано фізико-хімічні властивості білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікроміцетів. Вперше здійснено порівняння фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікроміцетів з відповідними властивостями mat-білків магнітотаксисних бактерій.

1. Загальний огляд літератури

1.1 Значення наночастинок у біотехнологічних процесах

Наночастинки демонструють характеристики, що залежать від розміру та форми, завдяки чому вони використовуються в різноманітних сферах, починаючи від біосенсорів та каталізаторів до оптики, хімічних датчиків та комп'ютерних транзисторів, а також електронних, логічних схем і схем пам'яті. Вони мають багато різних застосувань у різноманітних галузях, таких як медичне зображення, нанокompозити, фільтри, доставка ліків, гіпертермія пухлин [3-6] та нові антимікробні засоби.

Наночастинки зазвичай синтезують фізичними, хімічними та біологічними методами (зелений синтез). У фізико-хімічних методах неминуче використання токсичних або потенційно небезпечних розчинників, стабілізаторів і прекурсорів, тоді як біологічні методи не передбачають використання таких токсичних матеріалів. Біогенні реагенти, такі як рослинні екстракти, мікроорганізми, гриби, водорості та актиноміцети, використовуються в біологічних методах для формування або стабілізації НЧ з передовими антимікробними властивостями. Більшість із них є не тільки економічно ефективними, водорозчинними, нешкідливими та біосумісними відновниками та стабілізаторами, але також мають додаткові переваги, такі як покращення властивостей НЧ. Таким чином, зелений синтез антимікробних НЧ набув великого значення. Останніми роками ефективна зелена хімія використовується для виготовлення (Fe, Co, Zn, тощо) [5].

У нанотехнологіях нанорозмірні магнітні частинки та рідини, що містять ці частинки, займають визначне місце. Рідини називаються ферорідини або магнітні рідини або суперпарамагнітні рідини. У літературі є велика кількість оглядів, що описують можливі застосування в цих областях [7]. Магнетит і магеміт є найбільш часто використовуваними матеріалами для таких застосувань.

Хоча немає чіткої розмежувальної лінії, але загалом, коли хоча б один розмір матеріальної частинки менше 100 нм, її можна назвати наночастинкою. Залежно від розміру її називають квантовою точкою (0-D), нанодротом або нанотрубками (1-D), наноплівкою (2-D) або наноструктурою (3-D). Їх властивості, такі як механічна міцність, електрична поляризація, намагніченість і оптичні властивості, різко відрізняються від відповідних сипучих матеріалів і, отже, мають значний вплив майже в усіх галузях науки і техніки [8].

Одна з найбільш часто використовуваних областей нанотехнологій, яка останнім часом привертає увагу багатьох дослідників у всьому світі; є застосування нанотехнологій у медицині.

В останні роки сплави наночастинок стали одними з найпоширеніших наноматеріалів у світі. Різноманітність металевих, керамічних і полімерних сполук, таких як оксиди заліза, оксиди цинку, залізо-кобальт, нікель-кобальт, залізо-нікель, діоксид титану, золото, леговане Ag, мідні сплави, хітозан, гідроксиапатит тощо, що створюються хіміками та фізиками в передових лабораторіях. Існують різні методи синтезу сплавів наночастинок, такі як осадження, хімічне та фізичне осадження з парової фази, термічне та плазмове напилення, лазерне осадження, механічне сплавлення тощо. Завдяки вражаючим та унікальним хімічним, фізичним та антимікробним властивостям наночастинок разом із їх біосумісністю, ці матеріали знаходять конкретне застосування в різних галузях промисловості [5].

Таким чином, наночастинки зі сплавів різних металів широко використовуються у виробництві, сільському господарстві, екології, енергетиці, електроніці та медицині. Вони використовуються як промислові покриття, мастила, каталізatori, газові датчики, магнітні сепаратори, антиоксиданти, електроди паливних елементів, літій-іонні батареї, напівпровідники (фотоелектричні елементи), сонячні парові

пристрої, добрива в сільському господарстві, для підвищення терміну зберігання, при виробництві харчових ароматизаторів, парфумів, стійких до подряпин окулярів, флуоресцентних біологічних міток, для контрастного зображення при МРТ, для доставки ліків і генів, при імунологічному аналізі, біологічному виявленні патогенів, розділенні та очищенні біологічних молекул і клітин, діагностиці та лікуванні раку, знищенні пухлин за допомогою гіпертермії, в тканинній інженерії тощо [6].

Біогенні магнітні наночастинки на основі Fe та Co (БМН) мають різні біологічні застосування, включаючи діагностику та лікування, розділення, імунологічний аналіз, доставку ліків в очі та мозок, наноносії ліків, доставку генів та магнітно-резонансну томографію [5].

1.2 Переваги магнітних наночастинок у біомедицині та біотехнології

Зараз встановлено, що наночастинки (~ 10 нм) мають стійкі фізичні властивості, такі як механічна міцність, вища хімічну активність та характеризуються стійкістю до корозії. Крім того, їх розмір набагато менший, ніж у клітин, генів, вірусів тощо. Наприклад, типовий розмір клітини становить від 10 до 100 мкм, розмір вірусу – від 20 до 400 нм, а розмір білкової молекули – від 20 до 50 нм, в той час як розмір гена становить від 2 нм завширшки та від 10 до 100 нм завдовжки. Цей діапазон розмірів полегшує покриття або зв'язування біомолекул з наночастинками. Такі вкриті біомолекули називають «міченими». Крім того, якщо матеріал наночастинок є магнітним, то він матиме додаткові переваги. Розмір домену більшості магнітних матеріалів знаходиться в діапазоні 4-25 нм [8]. Однодоменна магнітна наночастинка (МН) діятиме як крихітний магніт. Помічена такою частинкою молекула може бути направлена в потрібне місце за допомогою зовнішнього магнітного поля. Єдиний запобіжний захід – вибір магнітного матеріалу з низькою токсичністю та його здатністю зв'язувати біомолекули. Зазвичай багато таких магнітних наночастинок бере участь у такому застосуванні.

Взаємодія між магнітними наночастинками і біомолекулами зазвичай відбувається в рідкому середовищі, тому використовуються МН у складі ферорідин. Щоб запобігти агломерації наночастинок у ферорідині, поверхню магнітних наночастинок модифікують або шляхом покриття поверхнево-активною речовиною, або їм надають електричний заряд [8].

1.3 Синтез біогенних магнітних наночастинок

Існує кілька методів отримання наночастинок загалом. Вони поділяються на дві великі групи, які називаються методами «зверху вниз» і «знизу вгору». Одним із простих методів отримання дисперсії магнітних наночастинок є метод подрібнення. Тут об'ємний феро/феримагнітний матеріал подрібнюється до нанорозміру шляхом застосування кульових млинів або барабанних млинів для подрібнення. Головним недоліком цього методу є забруднення наноматеріалів матеріалом кульок. При цьому форма наночастинок неправильна.

Для медичних застосувань МН зазвичай готують методами спільного осадження, термічного розкладання, лазерної абляції, мікроемульсії та хімічного осадження з парової фази або дугового розряду [3]. Ці методи дають сферичні та вузькодисперсні МН. Хоча феромагнітні метали, такі як залізо, кобальт і нікель, мають більшу намагніченість насичення, вони є токсичними, отже, зазвичай в медицині використовується оксид заліза у формі магнетиту (Fe_3O) або маггеміту (γFeO).

Поширення набуває також зелений синтез, який є альтернативою згаданим методам, які є дорогими, токсичними та шкідливими для навколишнього середовища. Щоб подолати ці проблеми, дослідники знайшли точні екологічні методи, тобто використання природних джерел та їх продуктів для синтезу НЧ. Зелений синтез можна класифікувати як:

- використання мікроорганізмів, таких як гриби, дріжджі (еукаріоти), бактерії та актиноміцети (прокаріоти),
- використання рослин і рослинних екстрактів
- використання шаблонів, таких як мембрани, ДНК вірусів, і діатомових водоростей [9].

Зелений синтез є екологічним, простим у застосуванні та низьковартісним, не потребує використання високої температури або тиску, а також не споживає небезпечних або токсичних матеріалів, не потребує

жодного синтетичного ліганду, блокуючого або стабілізуючого агента для біосинтезу наночастинок.

1.4 Класифікація досліджуваних мікрогрибів

Aspergillus — це сапрофітний гриб, який допомагає видаляти вуглець і азот із земної атмосфери. *Aspergillus* найчастіше зустрічається в ґрунті, де він росте на природних органічних залишках. У той час як *Aspergillus* переважно росте під землею, його спори швидко поширюються в повітрі, причому кожен гриб здатний утворювати тисячі конідій. Спори *Aspergillus* мають крихітний розмір (2-3 мкм), що дозволяє їм переміщатись на великі відстані у навколишньому середовищі через сильні повітряні потоки як на відкритому просторі, так і в приміщенні [10].

Ці спори широко розповсюджуються, і є великий шанс, що вони потраплять до легень пересічних людей. Хоча зазвичай немає ризику для здорових людей, *Aspergillus* особливо небезпечний для людей з ослабленим імунітетом, у яких спори, що передаються в повітрі, можуть призвести до виснажливої інвазивної інфекції, що називається аспергільозом, що часто виявляється смертельною [11].

Нитчатий гриб *Aspergillus oryzae* (рис. 1.1) є важливим штамом у традиційній ферментації та харчовій промисловості та часто використовується у виробництві соєвого соусу, соєвої пасти та виготовлення лікерів. Крім того, *A. oryzae* має потужну здатність виділяти велику кількість гідролітичних ферментів; тому його також використовували в ферментній промисловості як клітинну фабрику для виробництва численних нативних і гетерологічних ферментів. В останні роки, завдяки розшифровці всієї послідовності генома, фундаментальні дослідження та технології генної інженерії, пов'язані з виробництвом та використанням *A. oryzae*, були добре розроблені, такі як підвищення ефективності гомологічної рекомбінації, застосування селективних генних

маркерів, розробка технології видалення великих хромосом, використання методів злиття гіфів та застосування систем редагування геному CRISPR/Cas9. Розробка та впровадження цих технологій генної інженерії забезпечили значну технічну підтримку для промислового виробництва та застосування *A. oryzae* [12].

Розробка надійного та екологічно чистого процесу синтезу металевих наночастинок є важливим кроком у сфері застосування нанотехнологій. Одним із варіантів підвищення ефективності цієї біотехнології є використання мікроорганізмів, які володіють механізмом біомінералізації БМН, так як відомо, що мікроорганізми, які синтезують БМН, можуть здійснювати синтез тих металів, іони яких наявні у середовищі [13].

В роботі [13] досліджено біосинтез наночастинок срібла за допомогою *Aspergillus fumigatus*, який показав, що процес синтезу позаклітинний, досить швидкий, і наночастинки срібла утворюються протягом декількох хвилин після контакту іонів срібла з клітинним фільтратом *Aspergillus fumigatus*.

Види: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus oryzae*.



Рисунок 1.1 – Мікроскопічне зображення *Aspergillus oryzae* [14]

Trichoderma

Trichoderma spp. (рис. 1.2) це гриби, які присутні майже в усіх ґрунтах та інших різноманітних середовищах існування. У ґрунті вони часто є найціннішими культивованими грибами. Їх росту сприяє наявність великої кількості коренів рослин, які вони легко колонізують. Деякі штами мають високу ризосферну компетентність, тобто здатні колонізуватися та рости на коренях у міру розвитку. Найбільш ризосферно-компетентні штами можна додавати в ґрунт або насіння будь-яким способом. Як тільки вони вступають у контакт з корінням, вони колонізують поверхню кореня або кору, залежно від штаму. Таким чином, якщо додати *Trichoderma spp.* як обробку до насіння, деякі штами колонізують поверхню коренів, навіть якщо коріння знаходяться на метрі або більше під поверхнею ґрунту, і вони можуть зберігатися в корисній кількості до 18 місяців після застосування. Однак більшість штамів не мають цієї здатності [15].

Ці універсальні гриби використовуються в комерційних цілях різними способами, зокрема: продукти харчування та текстиль: *Trichoderma spp.* є високоефективними продуцентами багатьох позаклітинних ферментів.

Вони комерційно використовуються для виробництва целюлаз та інших ферментів, які розкладають складні полісахариди. Для цих цілей вони часто використовуються в харчовій і текстильній промисловості. Наприклад, целюлази з цих грибів використовуються для «біозшивання» джинсових тканин для отримання м'якої вибіленої тканини — випраного деніму. Ферменти також використовуються в кормах для птиці для підвищення засвоюваності геміцелюлози з ячменю або інших культур.

Trichoderma spp. використовуються для стимулювання росту рослин: протягом багатьох років була відома здатність цих грибів прискорювати ріст і розвиток рослин, у тому числі, особливо, їхня здатність спричиняти утворення більш міцних коренів [16].

Представники роду *Trichoderma* здатні до зеленого синтезу біогенних магнітних наночастинок різних металів, таких як срібло, залізо. Дослідження біосинтезу наночастинок срібла з *Trichoderma harzianum* Th3 та його ефективність проти збудника комплексу кореневої гнилі арахісу у роботі [17] показало, що синтезовані наночастинки були знайдені поодинокими або агрегованими з круглою та однорідною формою та розміром 10–25 нм. Біосинтезовані наночастинки срібла (25, 50, 75, 100 ppm) були протестовані проти патогенів, показали, що *T. harzianum* Th3 демонструє ефективний контроль росту міцелію проти збудника комплексу кореневої гнилі арахісу.

Практична цінність та ефективність біогенного синтезу частинок металів була показана в роботах [17-21]. Серед ефектів від використання ізолятів *Trichoderma* важливо підкреслити антипатогенні властивості наночастинок срібла на основі ізоляту з грибів *Trichoderma* та їх антиоксидантні, цитотоксичні, протимікробні, протипухлинні і біокаталітичні властивості. Патогени та ракові захворювання є новою проблемою для здоров'я людини в усьому світі через значне підвищення полірезистентності. Отже, відчувається нагальна потреба у відкритті нових

біоматеріалів або ліків проти патогенів і ракових клітин. У зв'язку з цим опосередкований мікробами синтез наночастинок срібла може бути одним із шляхів вирішення цієї проблеми в біомедичній технології [19].

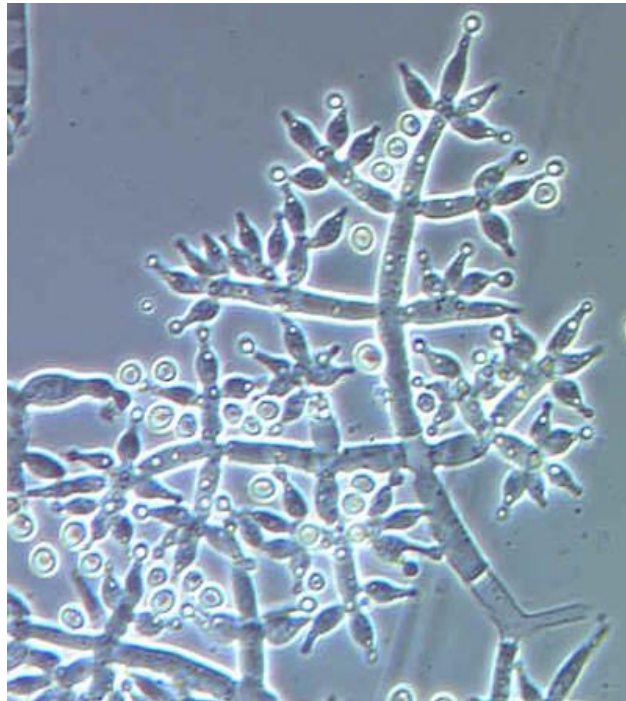


Рисунок 1.2 – Мікроскопічне зображення *Trichoderma spp.* [22]

Penicillium (рис.1.3) — рід аскоміцетних грибів, який є частиною мікробіому багатьох видів і має велике значення в природному середовищі, а також для виробництва харчових продуктів і ліків, при цьому можуть приводити до псування харчових продуктів.

Деякі представники роду *Penicillium* виробляють пеніцилін, молекулу, яка використовується у якості антибіотику, який пригнічує ріст певних видів бактерій. Кілька видів роду *Penicillium* відіграють центральну роль у виробництві сиру та різних м'ясних продуктів. Точніше, цвіль *Penicillium* зустрічається в блакитному сири. *Penicillium camemberti* та *Penicillium roqueforti* є пліснявою для камамбера, брі, рокфору та багатьох інших сирів. *Penicillium nalgiovense* використовується в м'яких сирах із дозрілою пліснявою, таких як сир Nalžovy (ellischau), а також для покращення смаку ковбас і шинки, а також для запобігання колонізації іншими цвілями та бактеріями [23].

На додаток до їх важливості в харчовій промисловості, види *Penicillium* і *Aspergillus* служать у виробництві низки біотехнологічних ферментів та інших макромолекул, таких як глюконоза, лимонна та винна кислоти, а також кілька пектиназ, ліпаз, амілаз, целюлази і протеази. Деякі види *Penicillium* продемонстрували потенціал для використання в біоремедіації, точніше в мікоремедіації, завдяки їхній здатності розщеплювати різноманітні ксенобіотичні сполуки [24].

Рід *Penicillium* включає широкий спектр видів цвілевих грибів, які є вихідними цвілевими грибами основних антибіотиків. Пеніцилін, препарат, що виробляється *P. chrysogenum*, був випадково відкритий Олександром Флемінгом у 1929 році, і було встановлено, що він пригнічує ріст грампозитивних бактерій. Види, які виробляють сполуки, здатні пригнічувати ріст пухлинних клітин *in vitro*, включають: *P. pinophilum*, *P. canescens* і *P. glabrum* [25].

Вторгнення харчових патогенів залишається серйозною проблемою для дослідників і регуляторів харчової промисловості. Впровадження нового типу потужного антибактеріального засобу має велике значення для боротьби з бактеріями та грибками. З метою дослідити новий антимікробний агент, такий як наночастинки оксиду заліза (IONP), які біосинтезуються простим, швидким, екологічно чистим та ефективним методом використовували *Penicillium roqueforti* MK805460.1. Отримані наночастинки оксиду заліза покривали шаром SiO₂. Біосинтезовані наночастинки були охарактеризовані за допомогою УФ-видимої спектроскопії, енергодисперсійного рентгенівського випромінювання (EDX), трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) і рентгенівської дифракції (XRD) [26]. Також були описані процеси синтезу шляхом зеленого синтезу для подолання стійкості шкідливих мікроорганізмів за допомогою біосинтезованих наночастинок срібла, виготовлених *Penicillium chrysogenum* F9 [25].



Рис. 1.3 – Мікроскопічне зображення *Penicillium* [27]

Види:

- *Penicillium albocoremium*
- *Penicillium bilaiae*,
- *Penicillium camemberti*,
- *Penicillium candidum*,
- *Penicillium chrysogenum*
- *Penicillium claviforme*
- *Penicillium expansum*
- *Penicillium glabrum*
- *Penicillium imranianum*
- *Penicillium italicum*
- *Penicillium lacussarmientei*
- *Penicillium lusitanum*
- *Penicillium purpurogenum*
- *Penicillium roqueforti*
- *Penicillium stoloniferum*

1.5 Синтез наночастинок мікрогрибами

Гриби мають потенціал для синтезу металевих наночастинок НЧ завдяки здатності до біоаккумуляції металу та їх толерантності, високій здатності зв'язування та внутрішньоклітинному поглинанню, як бактерії, з якими легко працювати в дослідницькій лабораторії [28]. Гриби можна використовувати різними методами для синтезу наночастинок, у яких гриби виділяють величезну кількість ферментів, які використовуються для відновлення розчину AgNO_3 у випадку синтезу наночастинок срібла. Схематичне зображення показано на рис. 1.4 [28].

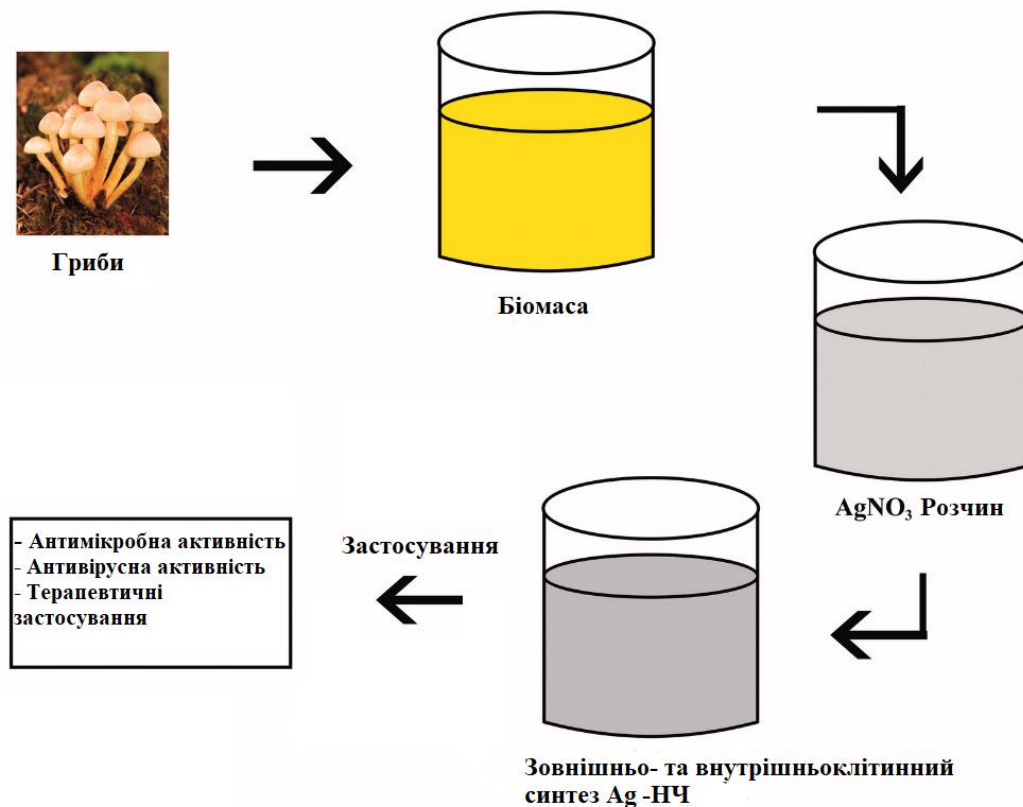


Рисунок 1.4 – Схема синтезу Ag-наночастинок за допомогою грибів [28]

Позаклітинний синтез Ag-НЧ за допомогою *Fusarium. oxysporum* та його антибактеріальну дію на текстильні тканини досліджували і довели, що монодисперсні НЧ срібла можна синтезувати за допомогою гриба *Aspergillus flavus*, середній розмір НЧ, спостерігається в діапазоні $8,92 \pm 1,61$

вимірювався за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) [29]. В іншому методі було проілюстровано *in vitro* синтез Ag-NP з використанням AgNO₃ як субстрату та *Penicillium fellutanum*, виділеного з прибережних мангрових відкладень [17]. Було досліджено, що водні іони Ag під впливом *Fusarium oxysporum* відновлюються в розчині за допомогою ферментативного процесу, що сприяє утворенню високостабільного гідрозолу Ag з наночастинками, що мають розміри в діапазоні 5–15 нм [19]. Позаклітинний синтез монодисперсних Ag-НЧ досягається за допомогою *Aspergillus fumigatus* із високою швидкістю синтезу [20]. В іншому методі сферичні Ag-NPs синтезовані, використовуючи *Aspergillus terreus* із середнім розміром 1–20 нм [30].

До інших металів, що синтезуються мікроміцетами, відносять золото, залізо, цинк, кобальт. Наночастинки цих металів мають численні антимікробні та протигрибкові застосування. Вони широко використовуються як антибактеріальне покриття в терапевтичних цілях, таких як серцево-судинні імплантати, ранові пов'язки, катетери, ортопедичні імплантати, стоматологічні композити, та для сільськогосподарських застосувань [30].

2. Матеріали і методи досліджень

2.1 Біоінформаційний аналіз мікрогрибів, як потенційних продуцентів БМН.

Дослідження здійснено з використанням програми “BLAST”, розробленої Національним центром біотехнологічної інформації (NCBI). Пошук BLAST дає змогу досліднику порівнювати досліджуваній білок або послідовність нуклеотидів з бібліотекою або базою даних послідовностей і ідентифікувати послідовності бази даних [31].

Ідея алгоритму базується на ймовірності того, що вирівнювання з багатьма збігами мають короткі фрагменти з високою ідентичністю. Потім ці фрагменти додатково збільшують в пошуках кращого та довшого вирівнювання. Зберігаючи ці сегменти, можна редагувати послідовність запиту перед пошуком і зберігати таблицю всіх можливих фрагментів, отриманих з вихідної послідовності. Алгоритм складає список усіх суміжних слів фіксованої довжини, які призводять до послідовності запиту з вищим балом, ніж параметр, який потрібно вибрати. Потім до цільової бази даних надсилається запит щодо слів у цьому списку, і знайдені збіги порівнюються, щоб знайти максимально можливі суміжні збіги в будь-якому напрямку.

Основним застосуванням BLAST є пошук паралогічних і ортологічних генів і білків в одному або кількох організмах [32].

Базовий інструмент пошуку локального вирівнювання (BLAST) знаходить у послідовностях області локальної подібності, порівнюючи нуклеотидні або білкові послідовності з відомими базами даних і обчислює статистичну значущість збігів. BLAST допомагає визначити функціональні та еволюційні зв'язки між послідовностями та використовується для ідентифікації членів сімейств генів [33].

Порівняння проводиться з геномом магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense*, що виробляє внутрішньоклітинні магнітні наночастинки, які називаються магнітосомами. Магнітосоми розташовані як нитка перлин на нитці і утворюють своєрідну магнітну стрілку компаса, за допомогою якої магнітотаксисні бактерії можуть переміщатися вздовж магнітного поля Землі. На відміну від наночастинок, отриманих хімічним шляхом, магнітосоми мають однорідну форму та розмір близько 40 нанометрів, ідеальну кристалічну структуру та магнітні властивості [34]. Вони також оточені біологічною мембраною, яка за потреби може бути оснащена додатковими біохімічними функціями. Таким чином, магнітосоми є надзвичайно перспективними для багатьох біомедичних і біотехнологічних застосувань.

Група вчених визначила критерії якості, необхідні для подальшого використання очищених магнітосом. До них належать, зокрема, гомогенність магнітосом, високий ступінь чистоти та цілісність мембрани, яка оточує кожен окрему магнітосому та забезпечує стабільність. Дослідники також розробили та оптимізували метод, за допомогою якого магнітосоми можна легко відокремити від бактерій. Отримані дані не тільки відповідають критеріям якості, але також підходять для розділення більших кількостей, необхідних для широкого спектру біомедичних і біотехнологічних застосувань магнітосом [34].

Сімейство програм BLAST поділяється на 5 основних програмних груп [35]:

Нуклеотидні: використовується при порівнянні досліджуваної нуклеотидної послідовності з відомою базою даних секвенованих нуклеїнових кислот:

Megablast - швидке порівняння для пошуку дуже схожих послідовностей,

dmegablast - швидке порівняння для пошуку розбіжних послідовностей з незначною подібністю,

blastn - повільне порівняння для пошуку всіх подібних послідовностей тощо.

Білкові: призначений для порівняння досліджуваної амінокислотної послідовності білка з існуючою базою даних білків та їх регіонів [35].

blastp - повільне порівняння для пошуку всіх подібних послідовностей, cdart – порівняння для пошуку гомологічних білків із доменною структурою,

rpsblast – порівняння з базою даних консервативних доменів,

psi-blast - порівняння, щоб знайти послідовності, які мають незначну подібність,

Транслюючі: може транслювати нуклеотидні послідовності в амінокислоти:

blastx - перетворює досліджувану послідовність нуклеотидів в амінокислоту і потім порівнює її з амінокислотними послідовностями білків, наявних в базі даних;

tblastn - досліджувана амінокислотна послідовність порівнюється з трансльованими послідовностями з бази даних;

tblastx - транслює досліджувану послідовність нуклеотидів в амінокислоту, а потім порівнює її з трансльованими послідовностями.

Геномні: призначені для порівняння досліджуваної послідовності нуклеотидів будь-якого організму (людини, миші тощо) з базою даних [35].

Для оцінки ступеня подібності враховувалися наступні показники [36]:

1. Ident (%) – показник, що демонструє кількість ідентичних амінокислотних залишків (АКЗ) порівнюваних білків. Якщо два білки мають більше ніж 45% ідентичних залишків, то вони мають дуже подібні структури та, швидше за все, мають однакові або спільні функції; якщо більше 25% є ідентичними залишками, вони, швидше за все, не мають

подібної структури, але механізми згортання подібні, тому гомологія білка не виключена; Ділянки з кількістю ідентичних амінокислотних залишків, що становить 18-24%, визначаються як «сумнівна зона», де допускається гомологія, але необхідно проводити їх додаткову перевірку [36].

2. E-value - показник, що відображає статистичну значущість вирівнювання, зменшення якого свідчить про менший рівень прояву випадкового фактора при ідентичності амінокислотних залишків порівнюваних білків. Величина показника числа E залежить від кількості ідентичних амінокислотних залишків у двох білках і наявності в базі даних відповідної інформації про амінокислотні послідовності протеома відповідного виду та залежить від розміру бази даних.

Якщо E-value має значення $\leq 0,05$, такі послідовності вважаються гомологічними [36].

3. Length - довжина вирівнювання. Цей показник повинен охоплювати більше 100 амінокислотних залишків.

4. Порівняння функцій mat-білків мікроорганізмів МТБ та білків гомологів мікроорганізмів МТБ у досліджуваних організмів.

2.2 Розрахунок фізико-хімічних властивостей білків методами BioPython

Щоб оцінити потенціал використання білків, вкрай важливо визначити їх функціональні властивості. До важливих функціональних характеристик білків належать кількість амінокислот у білку, частку амінокислоти в білку, його молекулярна вага, а також температура плавлення, ізоелектрична точка, вторинна структура та розчинність [37].

Базовий інструмент пошуку локального вирівнювання (BLAST) знаходить області подібності між послідовностями. Програма порівнює послідовності нуклеотидів або білків і обчислює статистичну значущість збігів. BLAST можна використовувати при дослідженні функціональних та еволюційних зв'язків між послідовностями, а також для визначення генетичних членів родин [35].

BioPython це найбільший і найпопулярніший пакет біоінформатики для Python. Він містить низку різних пакетів та модулів для загальних завдань біоінформатики. Він розроблений Чепменом і Чангом, в основному написаний на Python. BioPython – це набір пакетів та модулів, які забезпечують функції для роботи з ДНК, РНК і операціями з послідовностями білків, такими як транскрипція, трансляція, пошук мотивів у послідовностях білків тощо. BioPython надає багато аналізаторів для читання всіх основних генетичних баз даних наприклад GenBank, SwissPort тощо, а також оболонки/інтерфейси для запуску інших популярних програм/інструментів для біоінформатики, таких як NCBI BLASTN, Entrez тощо, у середовищі python.

Розрахунок характеристик обраних білків магнітотаксисних бактерій здійснюється з використанням таких методів пакету BioPython [38]:

- `count_amino_acids()` – підраховує, скільки разів амінокислота повторюється в послідовності білка;
- `get_amino_acids_percent()` – знаходить частку амінокислоти в білку, здійснює перевірку усіх 20 амінокислот;

- `molecular_weight()` – знаходить молекулярну масу молекули, вимірюється в а.о.м.;
- `aromaticity()` – обчислює значення ароматичності білка, а саме відносну частоту трьох ароматичних амінокислот: Фенілаланін, Триптофан, Тирозин;
- `instability_index()` – здійснює перевірку білків на стабільність;
- `flexibility()` – визначає гнучкість білку;
- `isoelectric_point()` – визначає ізоелектричну точку білку;
- `secondary_structure_fraction()` – метод повертає список часток амінокислот, які мають тенденцію утворювати спіралі, повороти або листі. Список містить 3 значення: [Helix, Turn, Sheet].

Ароматичні залишки є ключовими елементами білкових структур і важливі для стабільності структури, згортання та зв'язування з лігандами. Ізольовані ароматичні молекули мають тенденцію утворювати кластери вищого порядку, такі як тримери, тетрамери та пентамери, які приймають певні чітко визначені структури [39].

Ароматичні сполуки відіграють ключову роль у біохімії всього живого. Кожна з чотирьох ароматичних амінокислот гістидин, фенілаланін, триптофан і тирозин є одним із 20 основних будівельних блоків білків. Крім того, усі 5 нуклеотидів (аденін, тимін, цитозин, гуанін і урацил), які складають послідовність генетичного коду в ДНК і РНК, є ароматичними пуринами або піримідинами. Молекула гема містить ароматичну систему з 22 π -електронами. Хлорофіл також має подібну ароматичну систему.

Ароматичні сполуки важливі в промисловості. Ключовими ароматичними вуглеводнями, що представляють комерційний інтерес, є бензол, толуол, орто-ксилол і пара-ксилол. Щорічно у світі виробляється близько 35 мільйонів тонн. Їх добувають зі складних сумішей, отриманих шляхом переробки нафти або дистиляції кам'яновугільної смоли, і

використовують для виробництва ряду важливих хімічних речовин і полімерів, включаючи стирол, фенол, анілін, поліестер і нейлон [40].

Метод Лобрі і Готьє використовується як основа для розрахунку ароматичності, відносно частоти присутності ароматичних амінокислот: фенілаланіну, триптофану та тирозину [41]. Однак тирозин є не тільки ароматичною, а й полярною амінокислотою; а гістидин, попри наявність ароматичного кільця, класифікується як полярна амінокислота через свої властивості. Між бічними ланцюгами залишків ароматичних амінокислот відбуваються взаємодії, що називають ароматично-ароматичними і характеризуються як відносно неполярні. Їх роль полягає у підтримці комплексу білок-ДНК, а також загальної структури білкових послідовностей. Встановлено, що невід'ємною частиною належного функціонування білкової молекули є взаємодія між ароматичними залишками в білку, а також у комплексі білок-ДНК [39].

Індекс нестабільності дає оцінку стабільності білка. Білок, індекс нестабільності якого менше 40, вважається стабільним, значення вище 40 означає, що білок може бути нестабільним [42].

Гнучкість є важливим параметром, що впливає на забезпечення функцій білку. Динаміка або рухи в білку дозволяють його конформації змінюватися та реагувати на присутність інших молекул та/або зміни в навколишньому середовищі. Біологічні та біохімічні процеси, такі як передача сигналу, розпізнавання антигену, транспорт білка та ферментний каталіз, залежать від цієї здатності змінювати конформацію або адаптуватися до змін. Адаптивність, або гнучкість білка, може призвести до тонких змін, наприклад, коли кілька бічних ланцюгів амінокислот ферменту переміщуються, щоб зв'язати невеликий субстрат, або до більш значних змін, наприклад, коли згортанню певних білків сприяє наявність відповідного ліганду. Часова шкала конформаційних подій, які лежать в основі гнучкості білка, охоплює 13 порядків. Найшвидшими подіями є

вібрації ковалентних зв'язків і швидке обертання бічного ланцюга в інтервалі часу від пікосекунд до наносекунд. На іншому полюсі шкали часу може відбуватися дисоціація білок-ліганд і згортання білка. Повний опис динаміки і рухів у білку вимагає використання як експериментальних (перш за все спектроскопічних) методів, так і молекулярно-динамічного моделювання [43].

Ізоелектрична точка описує значення рН, при якому позитивні та негативні заряди білка, пептиду або амінокислоти, компенсують один одного. В ізоелектричній точці сумарний заряд речовини дорівнює нулю.

Ізоелектричну точку мають лише амфотерні речовини, тобто молекули з кислотними та основними групами, такі як амінокислоти, пептиди та білки. Якщо побудувати графічно сумарний позитивний і негативний заряди білка, наприклад, проти шкали рН, можна отримати криву сумарного заряду. Він перетинає вісь Х в ізоелектричній точці. У разі ізоелектричного фокусування білки в градієнті рН електрофоретично мігрують до своєї ізоелектричної точки і залишаються там, оскільки вони більше не мають там заряду. Деякі білки стають нерозчинними в їхній ізоелектричній точці та випадають в осад [44].

Вторинна структура відноситься до локальних складчастих структур, які утворюються всередині поліпептиду внаслідок взаємодії між атомами остова. Найбільш поширеними типами вторинних структур є α -спіраль і β -складчастий лист. Обидві структури утримуються у формі водневими зв'язками, які утворюються між карбонільною групою однієї амінокислоти та аміногрупою Н іншої.

В α -спіралі карбонільна група (C=O) однієї амінокислоти пов'язана водневим зв'язком з аміногрупою Н (N-H) амінокислоти, розташованої на чотирьох нижніх ланцюгах. Ця схема зв'язування втягує поліпептидний ланцюг у спіральну структуру, яка нагадує закручену стрічку, з кожним

поворотом спіралі, що містить 3,6 амінокислоти. R-групи амінокислот відходять від α -спіралі, де вони можуть вільно взаємодіяти.

У складчастому листі β два або більше сегментів поліпептидного ланцюга вишиковуються поруч один з одним, утворюючи листоподібну структуру, що утримується водневими зв'язками. Водневі зв'язки утворюються між карбонільними та аміногрупами основного ланцюга. Нитки β -складчастого листа можуть бути паралельними, спрямованими в одному напрямку (їх N- і C-кінці збігаються), або антипаралельними, спрямованими в протилежних напрямках (N-кінець однієї нитки розташований поруч до C-кінцем іншої) [45]. На відміну від спіралей, у яких донори та акцептори водневих зв'язків уздовж осі спіралі розділені 4 залишками, у β -листах донори та акцептори водневих зв'язків належать до різних ланцюгів і можуть бути відокремлені один від одного за допомогою довгих сегментів амінокислотної послідовності [46].

Амінокислоти в спіралі: V, I, Y, F, W, L.

Амінокислоти в повороті: N, P, G, S.

Амінокислоти в листі: E, M, A, L.

3. Результати і обговорення

3.1 Результати

Для пошуку потенційних продуцентів БМН були обрані наступні мікрогриби: *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus fumigatus* Af293, *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus* NRRL1, *Aspergillus ruber* CBS 135680, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavus* NRRL3357, *Aspergillus fischeri* NRRL 181, *Aspergillus terreus* NIH2624, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus luchuensis* IFO 4308, *Aspergillus westerdijkiae*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma reesei* QM6a, *Trichoderma virens* Gv29-8, *Trichoderma parareesei*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma brevicompactum*, *Trichoderma arundinaceum*, *Penicillium roqueforti* FM164, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium camemberti* FM 013, *Penicillium fuscoglaucum* FM041, *Penicillium carneum* LCP05634, *Penicillium paneum* FM227, *Penicillium biforme* FM169, *Penicillium rubens* Wisconsin 54-1255, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium digitatum* Pd1.

За основу було взято мікрогриби, досліджені у роботі [47], але вирівнювання було доповнено новими видами, і мікророрганізми, які мали лише частково розшифрований геном серед досліджених у роботі [47], були досліджені повторно.

Для цього оцінювалась ступінь подібності білків грибів з білками біомінералізації БМН магнітотаксисної бактерії *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, для якої докладно вивчено механізм біомінералізації БМН. Результати наведено в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Результати вирівнювань послідовностей білків *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, та білків мікрогрибів

Організм	Синтез частинок	Повнота геному	E-value; Ident, %; Length; білок-гомолог MO МТБ											
			mamA	mamB	mamM	mamO	mamE	mamK	mamN	mamL	mamQ	mamD	mamH	mamZ
<i>Aspergillus</i>														
<i>Aspergillus nidulans FGSC A4</i>	Co	full	2e-09	3e-14	6e-16	0,87	1,1	0,003	4,9	1,2	1,9	3,2	1e-05	0,002
			22	25	25	40	45	22	52	50	41	33	29	43
			165	318	302	47	40	171	21	60	34	45	116	40
			RecName : Full=Protein bimA	hypothetical protein	hypothetical protein	hypothetical protein AN4494.2	origin recognition complex subunit 1	ACT_BO TCI Actin	hypothetical protein	hypothetical protein	hypothetical protein	hypothetical protein AN2601.2	hypothetical protein AN1612.2	hypothetical protein
<i>Aspergillus fumigatus Af293</i>	Ag	full	8e-10	7e-17	3e-15	0,74	0,6	0,007	0,055	0,37	0,46	3,8	7e-05	0,004
			23	25	23	27	57	25	30	38	30	26	40	29
			165	302	303	60	21	174	137	29	81	95	42	99
			20S cyclosome subunit (BimA/Nuc2/Cdc27), putative	cation efflux family protein, putative	cation efflux family protein, putative	ubiquitin-protein ligase (Hul4), putative	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit Nas2, putative	actin Act1 [Aspergillus fumigatus Af293]	MFS transporter Fmp42, putative	conserved hypothetical protein	dihydroxy-acid dehydratase, putative	TMEM1 family protein, putative	MFS transporter, putative	MFS sugar transporter, putative
			2e-09	6e-08	3e-14	1.1	0.47	0,002	4,9	1,2	1,4	0,91	0,002	0,031

<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	Au	full	22	35	24	40	36	22	52	49	62	42	38	42
			165	86	313	47	39	171	21	79	24	36	39	38
			20S cyclosome subunit (BimA/Nuc2/Cdc27), putative	cation efflux family protein, putative	cation efflux family protein, putative	60S ribosomal protein L23	inositol 5-phosphatase, putative	actin	hypothetical protein	MFS transporter, putative	nonribosomal peptide synthase, putative	nucleoporein, putative	MFS transporter, putative	MFS transporter, putative
<i>Aspergillus niger</i>	Au	full	9e-08	1e-09	3e-06	4,0	23	0,008	0,014	1,8	9,0	27	0,15	2,8
			21	24	29	33	34	23	31	29	28	37	24	26
			165	304	94	43	56	152	67	49	50	38	118	120
			protein bimA	cation efflux family protein	hypothetical protein CBS147346_7484	NAD(P)-binding protein	hypothetical protein CBS11350_1093	beta-actin, partial	WD-repeat protein	hypothetical protein CBS13152_9489	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	hypothetical protein CBS147346_3718	hypothetical protein ASPNIDR AFT_121846, partial	uncharacterized protein BO96DR AFT_339434
<i>Aspergillus ruber</i> CBS 135680	-	full	9e-09	0,003	6e-06	0,79	2,3	6e-04	0,84	0,16	1,6	1,7	0,002	0,013
			23	38	30	38	52	21	31	61	28	26	31	45
			156	81	94	47	27	205	39	18	64	65	55	38
			TPR-like protein	uncharacterized protein EURHED RAFT_417533	uncharacterized protein EURHED RAFT_417533	sodium/hydrogen exchanger 3	dihydroxyacetone synthase	Actin/actin-like protein	uncharacterized protein EURHED RAFT_43	uncharacterized protein EURHED RAFT_452075	uncharacterized protein EURHED RAFT_408813	cell cycle control protein	MFS transporter	MFS transporter

									4047, partial					
<i>Aspergillus ustus</i>	-	full	0,11	0,47	0,38	3,1	1,4	0,096	0,70	0,61	1,1	0,72	0,015	0,042
			29	33	33	26	26	29	38	29	33	37	21	33
			73	46	42	80	76	41	29	48	30	35	171	67
			hypothetical protein HK57_00535	polyketide synthase	hypothetical protein HK57_00390	nonribosomal peptide synthase	polyketide synthase	UbiA prenyltransferase family protein	hypothetical protein HK57_00548	hypothetical protein HK57_00128	peroxidase	hypothetical protein HK57_00203	hypothetical protein HK57_00480	hypothetical protein HK57_00415
<i>Aspergillus flavus NRRL3357</i>	Ag	full	1e-07	4e-14	4e-11	3,3	1,5	0,002	3,1	1,0	5,4	5,7	0,22	0,51
			24	28	24	48	45	23	34	69	42	24	21	52
			155	287	300	31	40	172	41	13	53	49	134	27
			uncharacterized protein G4B84_010990	uncharacterized protein G4B84_009057	uncharacterized protein G4B84_009057	hypothetical protein AFLA_004921	uncharacterized protein G4B84_009825	actin	hypothetical protein AFLA_012347	uncharacterized protein G4B84_002392	uncharacterized protein G4B84_004431	hypothetical protein AFLA_010633	uncharacterized protein G4B84_004735	uncharacterized protein G4B84_010691
<i>Aspergillus fischeri NRRL 181</i>	Au	full	8e-10	3e-10	3e-07	0,24	0,79	0,001	0,64	0,25	0,50	1,3	8e-05	0,008
			23	39	29	41	45	23	24	33	33	38	40	30
			165	85	94	41	40	172	70	58	58	67	42	99
			20S cyclosome subunit (BimA/Nuc2/Cdc2)	cation efflux family protein, putative	cation efflux family protein, putative	histidine kinase G2, putative	origin recognition complex subunit Orc1, putative	actin	fungal specific transcription factor, putative	phosphate transporter	phosphate transporter	uncharacterized protein NFIA_067300	MFS transporter, putative	hexose carrier protein

			7), putative											
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	Ag	full	2e-07	2e-15	1e-08	1,7	1,3	0,001	7,5	1,0	1,6	3,4	0,050	0,13
			24	26	28	46	29	23	33	35	39	32	27	29
			155	307	180	37	160	172	45	46	31	57	91	59
			protein bimA	conserved hypothetical protein	conserved hypothetical protein	conserved hypothetical protein	conserved hypothetical protein	actin	conserved hypothetical protein	predicted protein	conserved hypothetical protein	predicted protein	inorganic phosphate transporter PHO84	hypothetical protein ATEG_09963
<i>Aspergillus sojae</i>	-	full	2,4	0,19	0,062	3,5	2,9	1,9	0,24	0,95	0,50	0,59	0,63	3,3
			30	21	26	31	44	32	35	37	26	34	29	27
			23	57	27	48	25	25	31	27	50	29	45	41
			cytochrome b, partial	NADH dehydrogenase subunit 4	truncated polyketide synthase	transcription factor AmyR	alpha-amylase	Chain B, alpha-glucosidase C-terminal polypeptide	cytochrome oxidase subunit 1, partial	Mating-type a-pheromone receptor, partial	O-methyltransferase, partial	RecName: Full=Alpha-L-arabinofuranosidase axhA; AltName: Full=Arabinoxylan arabinofuranohydrolase axhA; Flags: Precursor	potential toxin transporter, partial	truncated polyketide synthase
<i>Aspergillus</i>	-	full	1e-08	8e-10	7e-07	2,4	0,24	0,001	1,9	0,15	5,4	3,2	0,014	1,0
			21	24	19	40	32	23	24	32	41	38	25	44

<i>luchuensis</i> IFO 4308			165	300	260	47	56	172	59	56	27	37	118	27
			hypothetical protein AKAW_04543	cation efflux family protein	cation diffusion facilitator 1	alkaline serine protease	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit Nas2	actin	ubiquitin thiolesterase (OtuB1)	alkaline ceramidase family protein	hypothetical protein AKAW_02929	cytochrome P450 family protein	phosphate:H⁺ symporter	MFS sugar transporter
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	-	full	1,5	1,3	4,4	2,8	1,8	0,27	0,043	0,18	0,37	1,4	0,011	2,1
			24	33	32	42	29	30	39	33	38	25	29	64
			63	42	34	19	24	40	41	27ч	26	59	69	11
			non-ribosomal peptide synthetase	TPA_exp: esterase	polyketide synthase	Cct8, partial	TPA_exp: non-cytosolic lipase-like A protein	polyketide synthase	halogenase	pre-rRNA processing protein Tsr1, partial	polyketide cyclase, partial	pre-rRNA processing protein Tsr1, partial	polyketide synthase	TPA_exp: non-cytosolic esterase/lipase

Cladosporium

<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	full	0,14	0,29	0,2	1,3	2	2,4	1,5	4	0,044	0,16	2,5	0,85
			50	22	43	39	24	44	41	29	41	35	50	25
			20	54	14	23	25	25	22	14	22	48	14	51
			MAP kinase kinase PBS2, partial	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein, partial	RNA polymerase II largest subunit, partial	beta-tubulin, partial	RNA polymerase II subunit 2, partial	RNA polymerase II largest subunit, partial	RNA polymerase II subunit 2, partial	phosphoglucocerate kinase, partial	RNA polymerase II subunit 2, partial	RNA polymerase II subunit 2, partial	alpha-actin, partial	topoisomerase I, partial
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	full	1,5	0,64	0,55	1,8	0,79	0,001	4,2	9	0,052	0,57	0,28	0,098
			26	41	43	23	26	29	22	27	25	24	22	28
			31	29	14	56	27	93	58	49	40	117	85	64
			10-deacetylbutyryl accatin III 10-O-acetyltransferase	putative ANK-containing protein	RNA polymerase II largest subunit, partial	RecName: Full=Non-reducing polyketide synthase cla3; AltName: Full=Cladosporin biosynthe	heat shock protein 70, partial	heat shock protein 70	heat shock protein 70, partial	RecName: Full=Non-reducing polyketide synthase cla3; AltName: Full=Cladosporin biosynthe	hypothetical protein	RecName: Full=Non-reducing polyketide synthase cla3; AltName: Full=Cladosporin biosynthe	RecName: Full=Highly reducing polyketide synthase cla2; AltName: Full=Cladosporin biosynthe	putative glycoside hydrolase

						sis cluster protein 3				sis cluster protein 3		sis cluster protein 3	sis cluster protein 2	
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	full	1,9	3,9	1	1,3	0,15	0,16	0,62	1,4	0,052	0,47	2,4	0,039
			50	21	22	47	22	30	38	39	36	48	38	26
			14	52	116	15	36	23	24	18	22	25	16	47
			translation elongation factor 1-alpha, partial	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	translation elongation factor 1-alpha, partial	glycoside hydrolase family 51 protein	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	glycoside hydrolase family 51 protein	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	DNA-directed RNA polymerase II second largest subunit, partial	glycoside hydrolase family 51 protein	beta-tubulin, partial
<i>Fusarium</i>														
<i>Fusarium oxysporum</i>	CdS	full	2e-09	6e-09	6e-09	18	1,5	0,02	9,1	3,2	2,7	61	6e-05	0,004
			23	22	25	33	35	23	27	35	35	31	35	29
			165	311	237	48	46	172	63	37	37	91	52	139
			anaphase - promoting complex subunit 3	Mitochondrial metal transporter 2	Mitochondrial metal transporter 2	hypothetical protein FOMG_09068	hypothetical protein FOYG_04680	actin, gamma	hypothetical protein FOMG_17806	hypothetical protein FOXG_19039	hypothetical protein FOVG_18499	hypothetical protein FOXB_06229	hypothetical protein FOXB_08625	hypothetical protein FOVG_11397
			7e-08	5e-10	3e-10	2,1	0,46	0,003	2,6	1,6	1,2	4,7	0,29	0,12

<i>Fusarium solani</i>	Ag	full	22	22	22	40	26	22	34	28	33	25	25	26
			165	284	260	40	188	171	47	58	63	55	127	130
			uncharacterized protein B0J15DR AFT_293720	cation efflux family-domain-containing protein	uncharacterized protein B0J15DR AFT_74730	fungus-specific transcription factor domain-containing protein	trypsin-like cysteine/serine peptidase domain-containing protein	actin family	uncharacterized protein B0J15DR AFT_185177	major facilitator superfamily domain-containing protein	uncharacterized protein B0J15DR AFT_440860	heterokaryon incompatibility protein-domain-containing protein	major facilitator superfamily domain-containing protein	putative class V chitinase

Trichoderma

<i>Trichoderma reesei QM6a</i>	-	full	0,086	3,6	0,014	1,8	2,1	0,001	0,36	0,19	1,5	0,76	0,020	0,031
			27	34	33	25	44	22	29	28	39	34	25	28
			73	50	93	59	39	171	98	57	49	73	96	92
			hypothetical protein TRIREDRAFT_3707	proteasome, subunit beta 4	carnitine acetyl transferase	hypothetical protein TRIREDRAFT_103655	N-terminal binuclear Zn cluster-containing /DNA binding domain-containing protein	hypothetical protein TRIREDRAFT_44504	hypothetical protein TRIREDRAFT_123695	Ca2+ transporter	polyketide synthase	glycoside hydrolase family 55	sugar transporter	sugar transporter
<i>Trichoderma virens Gv29-8</i>	Ag	full	1e-12	1e-11	5e-07	1,4	1,9	0,002	0,73	0,52	0,17	2	0,005	0,034
			25	25	25	24	44	22	29	33	33	46	28	29
			165	226	240	143	34	171	59	33	66	39	94	92
			hypothetical protein TRIVIDRAFT_88351	hypothetical protein TRIVIDRAFT_117609, partial	hypothetical protein TRIVIDRAFT_117609, partial	non-ribosomal peptide synthetase	hypothetical protein TRIVIDRAFT_201746	hypothetical protein TRIVIDRAFT_185456	hypothetical protein TRIVIDRAFT_28903	hypothetical protein TRIVIDRAFT_67298	putative Pfs NACHT and ankyrin-domain-containing protein	hypothetical protein TRIVIDRAFT_75875	hypothetical protein TRIVIDRAFT_40830	hypothetical protein TRIVIDRAFT_76958
<i>Trichoderma parareesei</i>	Ag	full	2e-12	9e-13	4e-07	0,21	0,88	0,001	0,4	0,21	0,17	0,32	0,007	0,032
			25	25	24	23	29	22	29	28	35	44	28	28
			165	224	238	142	58	171	98	57	55	48	94	92
			bimA	hypothetical protein A9Z42_0061710	hypothetical protein A9Z42_0061710	hypothetical protein A9Z42_0087770	BZIP transcriptional regulator transcripti	actin	hypothetical protein A9Z42_0025120	Calcium transporter	hypothetical protein A9Z42_0006440	Aldehyde dehydrogenase	hypothetical protein A9Z42_0009740	MFS permease

							on factor JlbA/IDI-4							
<i>Trichoderma hamatum</i>	-	full	1,1	0,27	1	0,74	0,41	0,36	0,25	2,1	0,079	2,2	0,42	2,1
			33	40	28	27	37	40	34	24	37	31	32	16
			40	43	57	41	46	25	35	21	38	26	38	89
			RNA polymerase II subunit, partial	NADH dehydrogenase subunit 4 (mitochondrion)	NADH dehydrogenase subunit 4L (mitochondrion)	RNA polymerase II second largest subunit, partial	chitinase 18-5, partial	NADH dehydrogenase subunit 5 (mitochondrion)	cytochrome c oxidase subunit 1 (mitochondrion)	translation elongation factor 1 alpha, partial	ATP synthase F0 subunit 9 (mitochondrion)	ATP citrate lyase large subunit, partial	LAGLID ADG endonuclease (mitochondrion)	NADH dehydrogenase subunit 3 (mitochondrion)
<i>Trichoderma koningii</i>	-	full	0,72	1,6	1,9	0,47	0,89	0,019	0,2	1,8	0,78	0,73	0,36	2,6
			30	25	46	29	39	33	24	33	20	38	25	30
			60	59	24	48	23	48	51	21	64	45	88	53
			RNA polymerase II subunit, partial	ACEI	chitinase Chit36, partial	phospholipase A2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - fungus	zinc finger transcription factor Tkc6	cellulase repressor protein	phospholipase A2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - fungus	cellulase repressor protein	endoglucanase	RecName: Full=Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2; Short=GAPDH2
<i>Trichoderma guizhouense</i>	Fe	full	4e-12	6e-13	7e-11	0,46	1,5	0,002	0,01	0,097	0,42	0,026	0,005	0,027
			25	23	24	25	62	22	27	30	28	44	28	26
			165	303	309	163	21	171	101	57	58	45	94	90
			bimA	cation efflux family protein	cation efflux family protein	beta-lactamase-like protein	hypothetical protein A0028_0069680	actin	hypothetical protein A0028_0071090	Calcium transporter	hypothetical protein A0028_0093610	hypothetical protein A0028_0005960	hypothetical protein A0028_0052820	MFS permease (glucose permease HXT1)

<i>Trichoderma koningiopsis</i>	-	full	0,27	3,5	3	1,3	2,7	2,2	0,73	1,1	3,3	2	0,33	24
			30	43	29	50	38	26	26	29	21	31	43	67
			53	14	28	18	40	46	34	35	70	26	23	9
			RNA polymerase subunit II, partial	RNA polymerase II subunit 2, partial	glycoside hydrolase family 3 protein	nitrate reductase, partial	endochitinase	actin, partial	exo-beta-1,3-glucanase	glycoside hydrolase family 3 protein	glycoside hydrolase family 3 protein	ATP citrate lyase large subunit, partial	exo-beta-1,3-glucanase	translation elongation factor 1-alpha, partial
<i>Trichoderma gamsii</i>	Ag	full	3e-09	4e-14	2e-12	1,7	3,8	0,003	0,54	0,29	1,5	0,2	0,001	0,064
			24	26	24	27	36	22	40	30	35	21	29	28
			164	223	315	81	53	171	48	60	37	90	94	92
			hypothetical protein TGAMA5MH_03372	hypothetical protein TGAMA5MH_00139	hypothetical protein TGAM01_v204836	hypothetical protein TGAM01_v204288	fungal specific transcription factor domain-containing protein	hypothetical protein TGAMA5MH_10547	hypothetical protein TGAMA5MH_04157	hypothetical protein TGAM01_v207386	hypothetical protein TGAM01_v206834	primary-amine oxidase	hypothetical protein TGAMA5MH_10762	hypothetical protein TGAM01_v206208
<i>Trichoderma brevicompactum</i>	-	full	2,4	2	0,97	0,019	2,6	1,6	2,5	1,1	0,17	0,17	0,29	1,6
			32	43	29	42	30	26	34	24	60	27	36	35
			38	14	24	36	44	46	56	21	15	64	28	17
			15-O-acetyltransferase	RNA polymerase II second largest subunit, partial	tri11 protein	cytochrome P450 monooxygenase	cytochrome P450 monooxygenase	actin, partial	chitinase chi18-15, partial	translation elongation factor 1 alpha, partial	chitinase chi18-15, partial	cytochrome P450 monooxygenase	cytochrome P450 monooxygenase	cytochrome P450 monooxygenase
<i>Trichoderma arundinaceum</i>	Ag	full	2e-12	8e-12	2e-07	0,28	0,2	0,002	0,34	0,33	0,5	0,15	0,002	0,12
			25	24	24	22	53	22	36	31	31	23	29	27
			165	224	238	158	40	168	45	59	59	74	94	92

			tetratrico peptide-like helical	cation efflux	cation efflux	progesterone binding	hypothetical protein TARUN_4031	actin beta gamma 1	hypothetical protein TARUN_6517	methionine permease	spindle pole body component alp4	copper amine oxidase	phosphate transporter	glucose transporter
--	--	--	--	----------------------	----------------------	----------------------	---------------------------------	---------------------------	---------------------------------	---------------------	----------------------------------	----------------------	-----------------------	---------------------

Penicillium

<i>Penicillium roqueforti</i> FM164	Fe	full	4e-09	7e-21	8e-11	0,47	1,3	0,003	0,18	0,49	7e-04	0,53	0,002	0,38	
			23	26	25	31	40	23	47	38	34	26	30	36	
			154	317	327	70	47	172	30	45	70	38	91	45	
			Protein bimA	Cation efflux protein	Cation efflux protein	Beta-ketoacyl synthase	Mitochondrial carrier domain	Actin, gamma	Peptidase M20	unnamed protein product	hypothetical protein PRO QFM164_S01g_001727	YTH domain	General substrate transporter	hypothetical protein PROQFM164_S04g_000861	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ag	full	8e-10	6e-22	4e-12	1,3	0,4	0,005	0,97	0,33	0,97	0,43	3e-04	0,17	
			23	26	24	28	38	30	47	39	30	22	29	26	
			154	318	330	122	50	69	30	31	54	65	90	221	
			Protein bimA	Mitochondrial metal transporter	Mitochondrial metal transporter	Argonaute-family protein PcAgo2	hypothetical protein EN45_10_2450	RecName: Full=Actin, gamma	putative di- and tripeptidase	hypothetical protein EN45_03_4970	Adenine phosphoribosyltransferase	Thiol-specific monooxygenase	Repressible high-affinity phosphate permease	Sugar transporter	
<i>Penicillium camemberti</i> FM 013	Ag	full	6e-09	2e-21	1e-11	1,4	0,47	0,003	0,6	0,37	0,94	1,3	0,005	0,19	
			23	27	24	43	32	23	47	39	43	40	27	35	
			154	304	301	40	38	172	30	31	35	48	96	66	
			Tetratricopeptide-like helical	Cation efflux protein	Cation efflux protein	unnamed protein product	Sphingomyelin phosphodiesterase	Actin/actin-like	Peptidase M20	Zinc finger, C2H2-type	Isochorismatase-like	Aldehyde/histidinol dehydrogenase	Sugar/inositol transporter	Sugar/inositol transporter	
<i>Penicillium fuscoglaucum</i> FM041	-	full	1,5	1,6	0,32	1,6	0,3	0,52	1	0,43	2,9	0,65	1,4	0,41	
			27	44	29	58	22	42	28	20	27	56	38	23	
			22	9	35	12	79	19	29	29	15	22	9	16	65
			alpha mating-type protein MAT1-1-1	alpha mating-type protein MAT1-1-1	alpha mating-type protein MAT1-1-1	alpha mating-type protein MAT1-1-1	elongation factor 1-alpha, partial	elongation factor 1-alpha, partial	alpha mating-type protein MAT1-1-1	elongation factor 1-alpha, partial	alpha mating-type protein MAT1-1-1	alpha mating-type protein MAT1-1-1	beta-tubulin, partial	alpha mating-type protein MAT1-1-1	

<i>Penicillium carneum</i> LCP05634	-	full	0,16	0,011	0,064	0,66	1,7	1,7	0,26	4	0,24	0,27	0,52	0,19
			100	37	33	42	36	33	42	31	29	54	38	47
			7	41	55	19	22	24	24	16	45	13	16	13
			cct8 protein, partial	putative IMP dehydrogenase type A, partial	TSR1 protein, partial	cct8 protein, partial	cct8 protein, partial	TSR1 protein, partial	mini-chromosome maintenance complex component 7, partial	TSR1 protein, partial	TSR1 protein, partial	beta-tubulin, partial	cct8 protein, partial	beta-tubulin, partial
<i>Penicillium paneum</i> FM227	-	full	0,29	0,018	0,11	1,1	4,0	3,2	0,46	1,1	0,35	0,68	0,8	0,58
			100	37	33	42	36	33	42	30	29	54	38	19
			7	41	55	19	22	24	0,24	27	45	13	16	42
			cct8 protein, partial	putative IMP dehydrogenase type A, partial	TSR1 protein, partial	cct8 protein, partial	cct8 protein, partial	TSR1 protein, partial	mini-chromosome maintenance complex component 7, partial	TSR1 protein, partial	TSR1 protein, partial	beta-tubulin	cct8 protein, partial	beta-tubulin, partial
<i>Penicillium bifforme</i> FM169	-	full	1,5	2,1	2,9	5,1	0,45	0,77	1,4	0,64	0,81	0,32	0,23	0,64
			26	41	32	47	22	42	44	20	33	42	30	29
			35	22	31	15	79	19	16	15	27	24	40	35
			RNA polymerase II second largest subunit, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	elongation factor 1-alpha, partial	elongation factor 1-alpha, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	elongation factor 1-alpha, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	RNA polymerase II second largest subunit, partial	calmodulin, partial
<i>Penicillium rubens</i>	Ag, Au	full	8e-10	4e-22	3e-12	1,2	0,42	0,005	1,2	0,21	1	0,42	4e-04	0,15
			23	26	24	28	38	30	33	42	30	22	29	30
			154	318	327	122	50	69	33	31	54	65	90	98

<i>Wisconsin 54-1255</i>			Pc13g04030	Pc12g05740	Pc12g05740	Pc22g03240	Pc22g02430	gamma-actin act-Penicillium chrysogenum	Pc22g00430	hypothetical protein, partial	Pc20g04610	Pc21g16030	Pc12g14750	Pc16g08170
<i>Penicillium brasilianum</i>	Au	full	3e-08	3e-20	4e-11	1,2	0,13	0,003	3,5	0,33	1,3	0,2	0,01	0,24
			21	26	24	40	27	22	37	30	33	41	23	40
			165	309	332	47	94	171	51	44	46	46	116	48
			Protein bimA	cation efflux family protein	Putative Function: MMT1 of S. cerevisiae is involved in the iron import in mitochondria	60S ribosomal protein L23-B	Zn(II)2Cys6 transcription factor	Actin, gamma	hypothetical protein PEBR_21070	flavin containing amine oxidase	hypothetical protein PMG11_07081	Putative Zinc knuckle domain protein	Putative Phosphate transporter	putative MFS transporter
<i>Penicillium digitatum Pd1</i>	Zn	full	8e-09	3e-21	1e-12	0,53	0,3	0,002	0,75	0,38	0,62	0,64	0,004	0,1
			23	26	25	42	23	23	47	39	35	28	28	28
			154	317	324	36	100	172	30	28	52	60	96	90
			20S cyclosome subunit (BimA/Nuc2/Cdc27), putative	Cation efflux family protein, putative	Cation efflux family protein, putative	hypothetical protein PDIP_64910	hypothetical protein PDIP_40960	Actin, gamma	WD repeat protein	hypothetical protein PDIP_30890	Regulator of gluconeogenesis Rmd5, putative	20S cyclosome subunit (Cut9/Cdc16), putative	Sugar transporter, putative	Sugar transporter, putative

3.1.2 Класифікація грибів за генетичним механізмом біомінералізації БМН

Досліджувані мікрогриби були класифіковані за генетичними механізмами біомінералізації БМН з різними типами внутрішньої будови на кристалічні та аморфні, а також за локалізацією в клітині на внутрішньоклітинні та зовнішньоклітинні згідно роботі [48]. Результати наведені у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Класифікація БМН досліджуваних грибів за типом внутрішньої будови та локалізацією

	Зовнішньоклітинні аморфні БМН (I група)	Зовнішньоклітинні кристалічні БМН (II група)	Внутрішньоклітинні аморфні БМН (III група)	Внутрішньоклітинні кристалічні БМН (IV група)
MamA	-	+	-	+
MamB	+	+	+	+
MamM	+	+	+	+
MamO	-	-	+	+
MamE	-	-	+	+
MamK	-	-	+	+

Вирівнювання показало, що більшість обраних мікрогрибів є потенційними продуцентами біогенних магнітних наночастинок. Усі організми, що мають задовільні результати біоінформатичного аналізу класифікуються як мікроорганізми, що синтезують зовнішньоклітинні кристалічні БМН, отже відносяться до другої групи.

3.1.3 Порівняння фізико-хімічних властивостей білків магнітотаксисних бактерій та мікрогрибів

Серед проаналізованих представників мікрогрибів було визначено таких, що мають найкращі показники за результатами вирівнювань, а також що мають практичну цінність та не шкідливі у застосуванні.

Представники відділу аскоміцети у більшості своїй беруть участь у синтезі таких металів як срібло та золото [11, 49]. Серед проаналізованих представників відділу аскоміцети було знайдено лише одного представника, який використовується для виробництва кобальту [11].

Представники роду *Cladosporium* мають незадовільні показники E-value, Ident, length, що є ключовими для визначення їх здатності до продукування БМН (таблиця 3.1). Літературний огляд також не показав можливості їх використання для синтезу наночастинок.

Обидва проаналізованих представники виду *Fusarium* показали позитивні результати як при здійснюванні вирівнювання (таблиця 3.1), так і у процесі літературного огляду і продемонстрували здатність до синтезу наночастинок металів [50].

Деякі представники роду *Trichoderma* мали задовільні результати вирівнювань (таблиця 3.1) і в роботах [17-21] показано їх здатність до синтезу срібла та золота, а саме *Trichoderma virens* Gv29-8, *Trichoderma parareesei* CBS 125925, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma arundinaceum*.

Задовільні показники спостерігались у представників роду *Penicillium*, які найбільш широко використовуються для виробництва наночастинок таких металів як золото і срібло [25], [26], [51], а також заліза та цинку [52, 53].

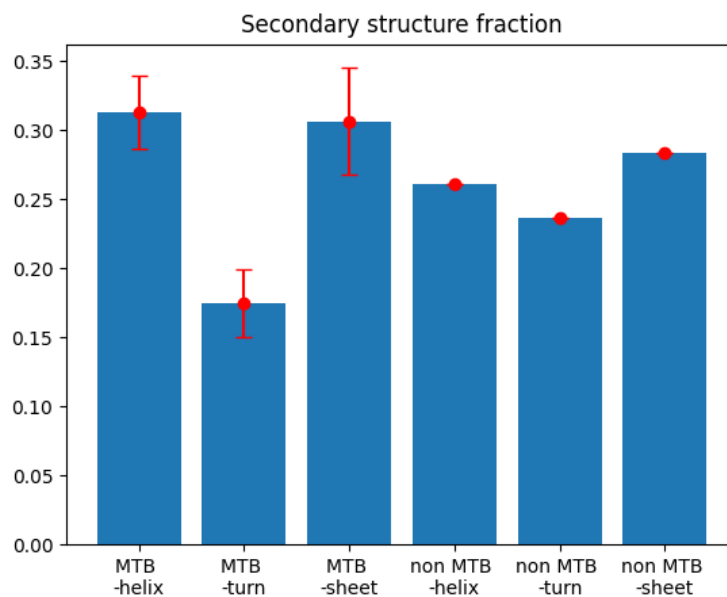
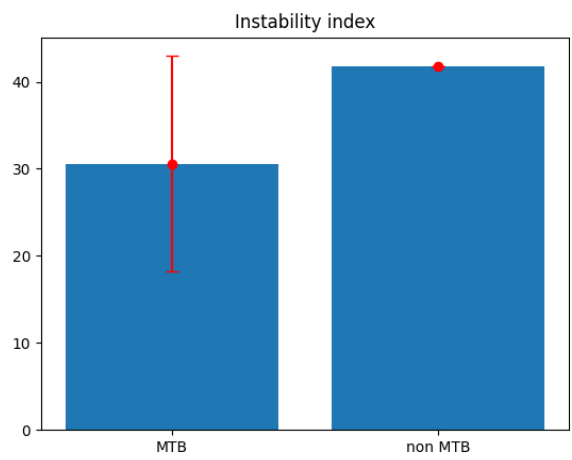
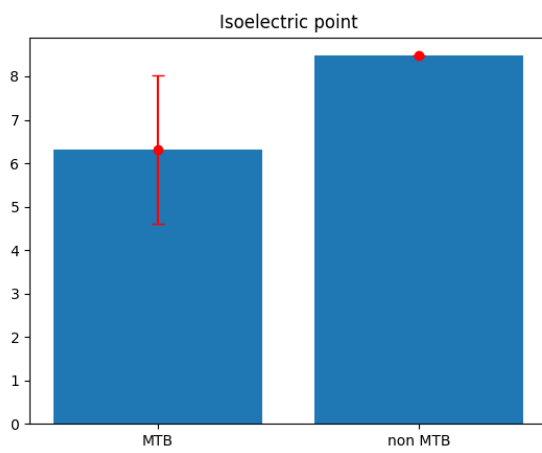
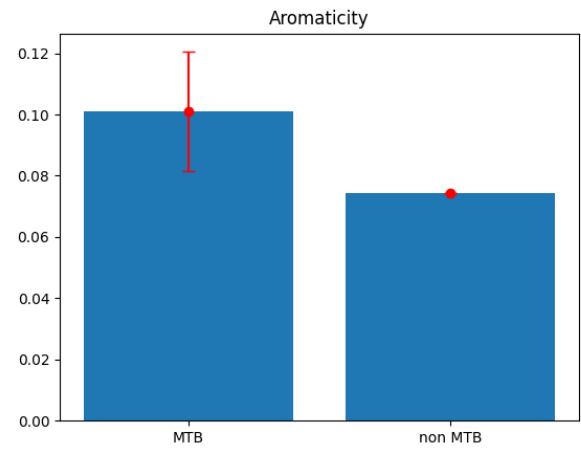
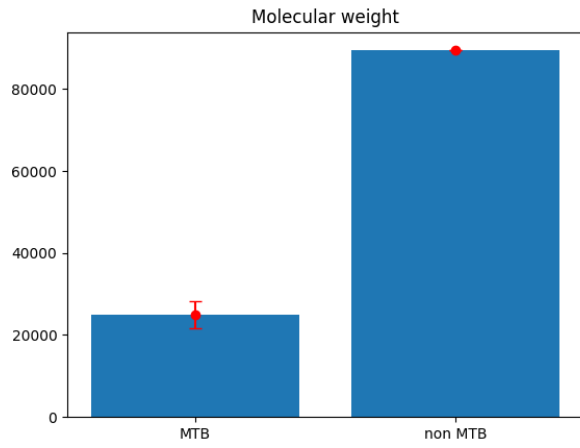
Щоб зрозуміти як фізико-хімічні властивості білків біомінералізації БМН залежать від ступеня їх подібності до відповідних білків магнітотаксисних бактерій *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*,

*Gamma*proteobacteria, *Ca. Etaproteobacteria*, *Ca. Lambdaproteobacteria* , *Zetaproteobacteria*, *Ca. Hydrogenedentes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Ca. Omnitrophica* було обрано є потенційних продуцентів внутрішньоклітинних кристалічних БМН, а саме *Fusarium oxysporum* та *Aspergillus flavus* NRRL3357, а також для порівняння одного з досліджених представників з незадовільними показниками, а саме *Trichoderma hamatum*.

Для розрахунку характеристик обраних білків МТБ використано наступні методи пакету Biopython [38]:

- `count_amino_acids()` – підраховує, скільки разів амінокислота повторюється в послідовності білка;
- `get_amino_acids_percent()` – допомагає знайти частку амінокислоти в білку, перевіряє всі 20 амінокислот;
- `molecular_weight()` – допомагає знайти молекулярну вагу молекули, вимірюється в а.о.м.;
- `aromaticity()` – обчислює значення ароматичності білка, а саме відносну частоту трьох ароматичних амінокислот: Фенілаланін, Триптофан, Тирозин;
- `instability_index()` – здійснює перевірку білків на стабільність;
- `flexibility()` – допомагає визначити гнучкість білку;
- `isoelectric_point()` – визначає ізоелектричну точку білку;
- `secondary_structure_fraction()` – метод повертає список часток амінокислот, які мають тенденцію бути у спіралі, повороті або листі. Список містить 3 значення: [Helix, Turn, Sheet].

Результати наведені на рисунках 3.1 – 3.12.



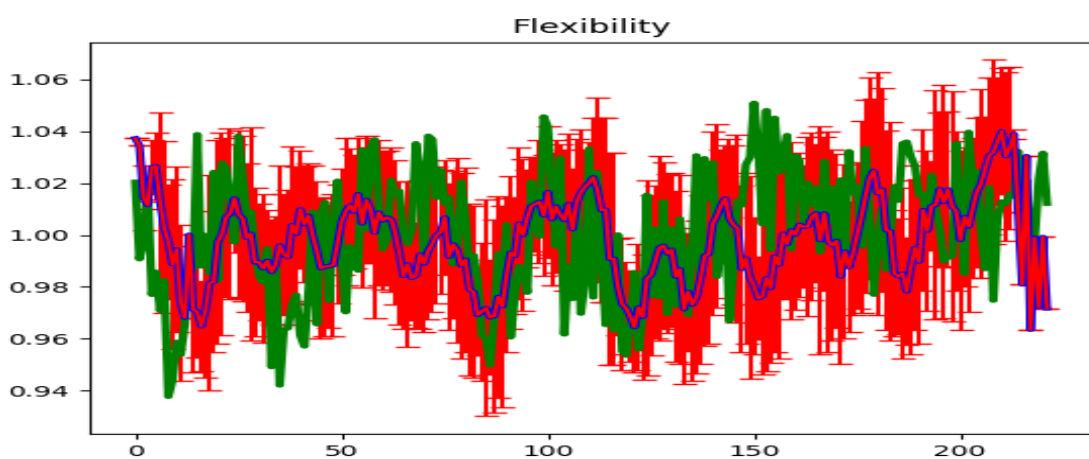
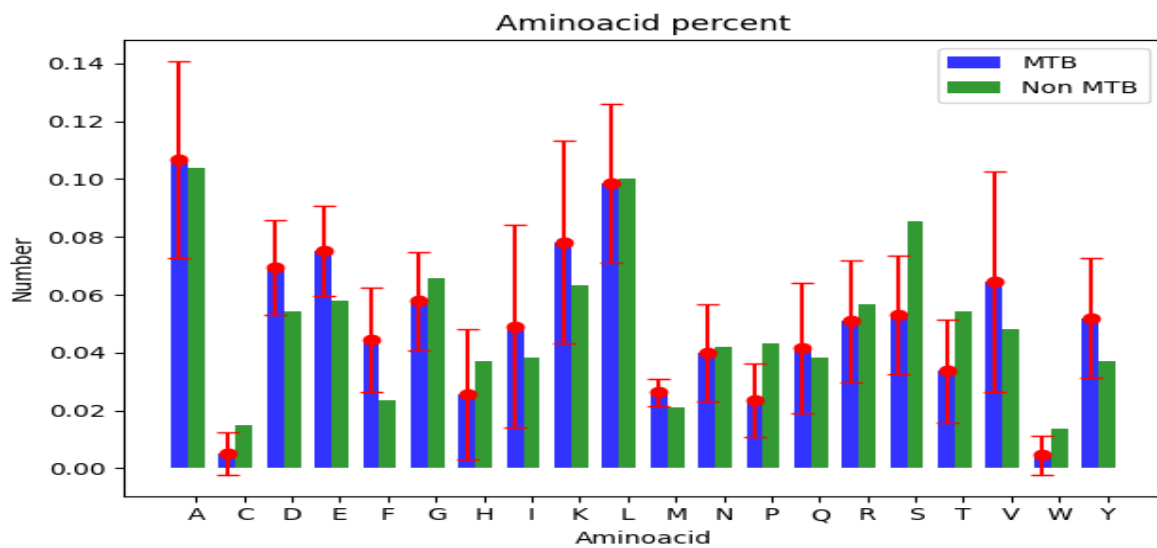
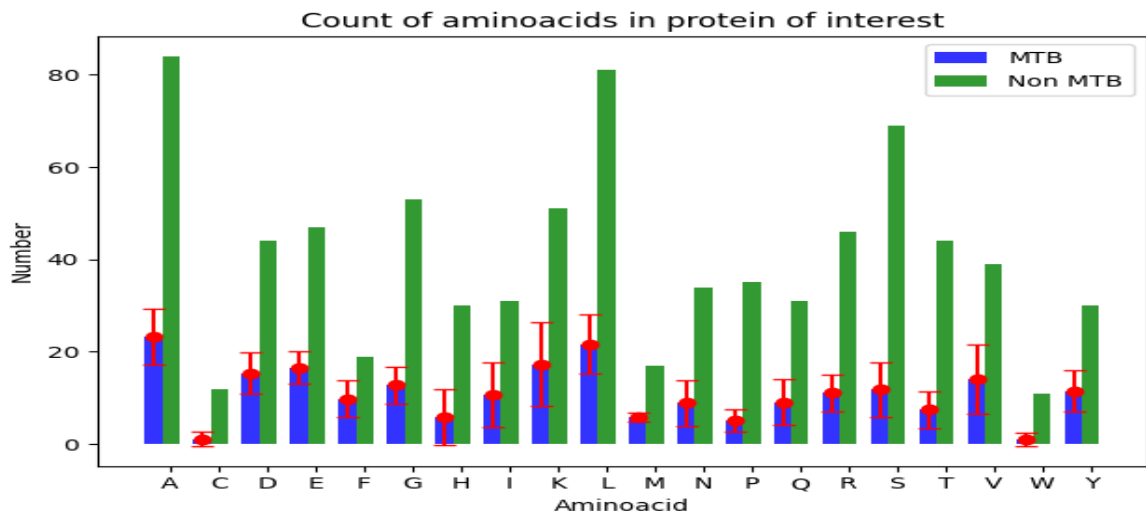
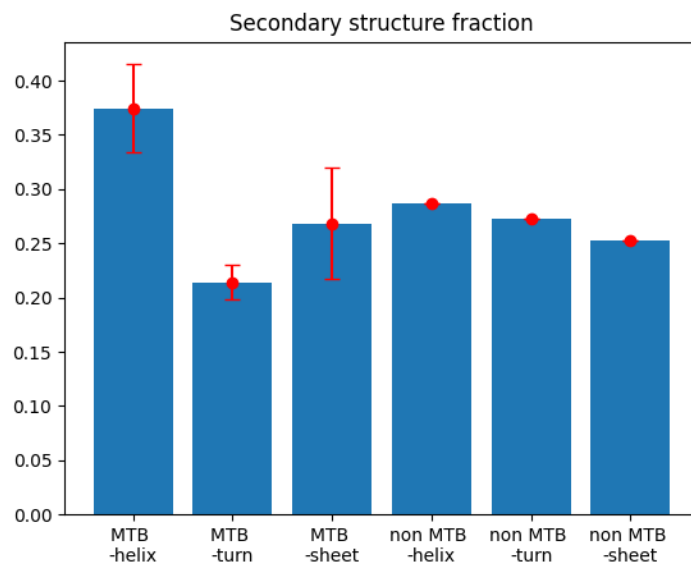
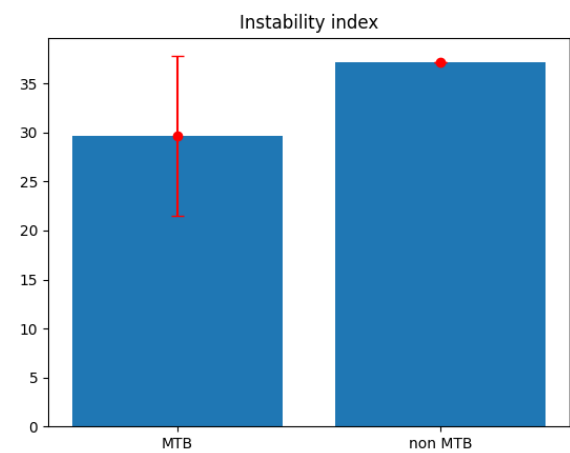
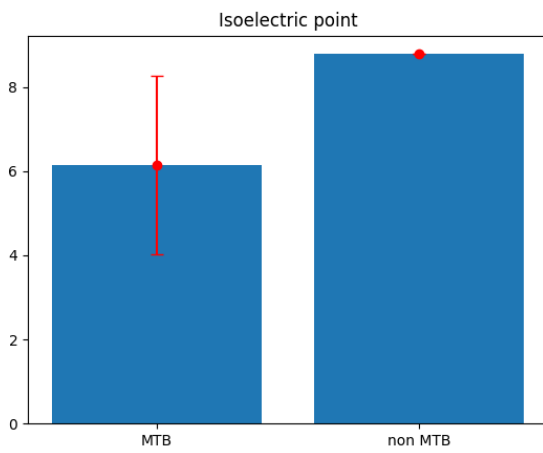
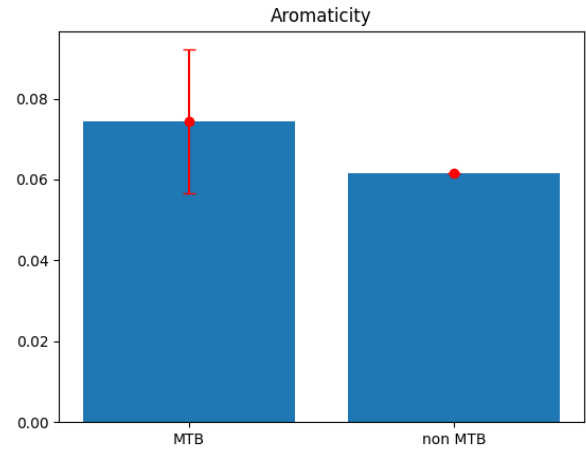
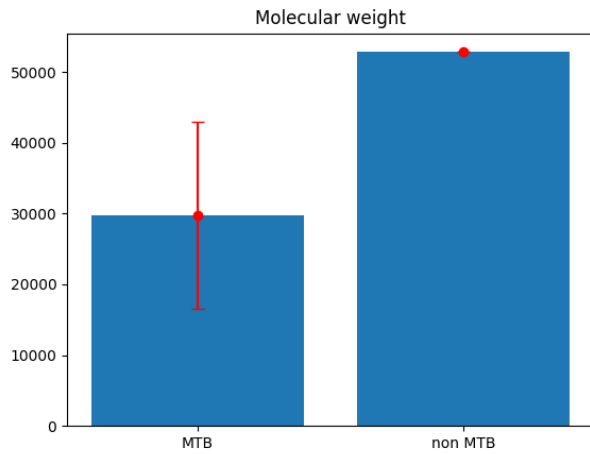


Рис. 3.1 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку таmA магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Aspergillus flavus*



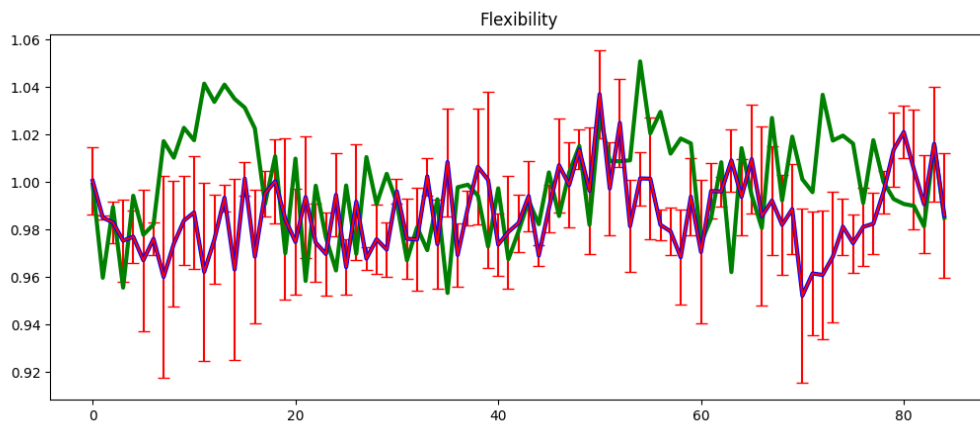
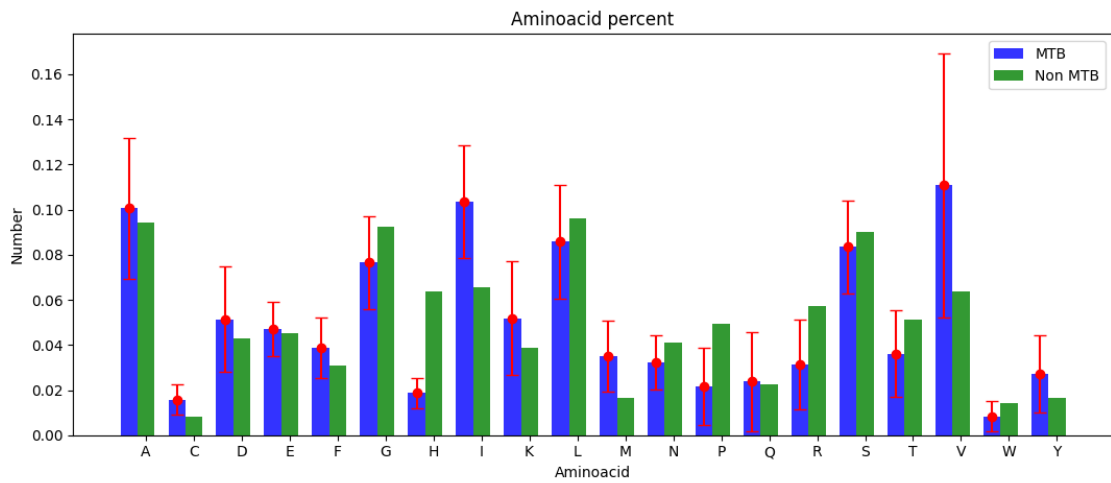
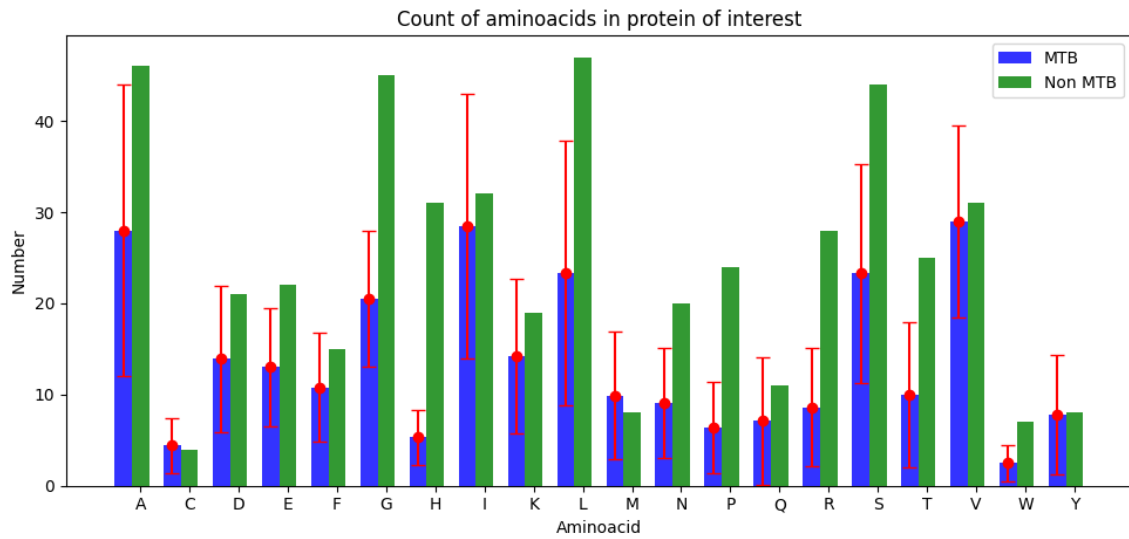
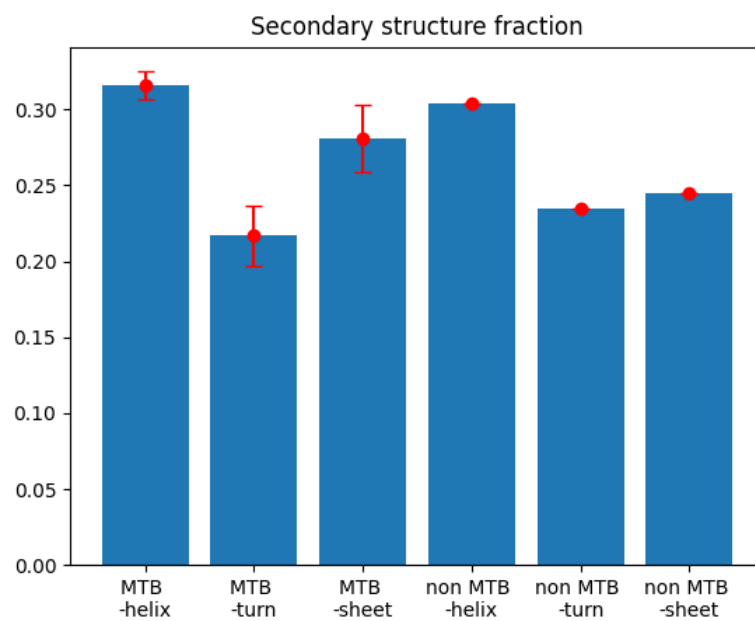
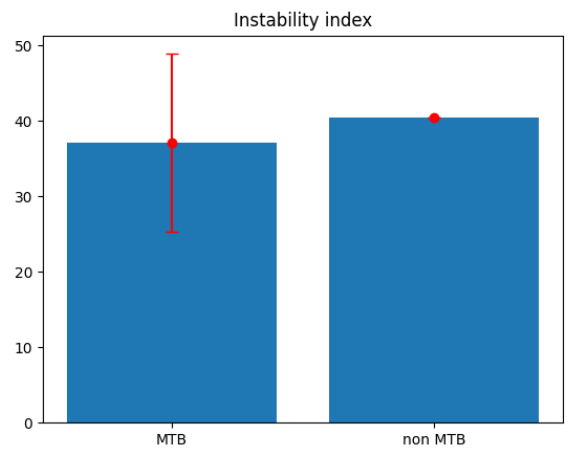
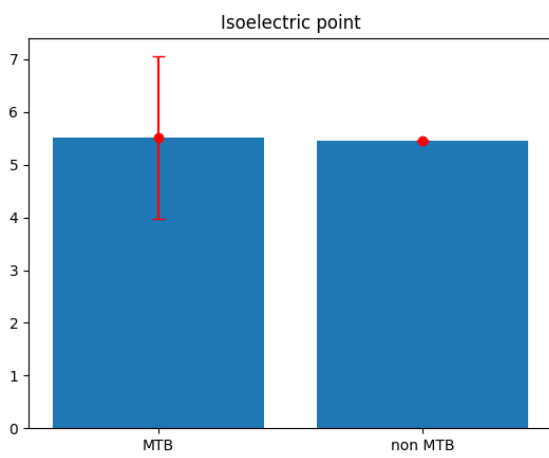
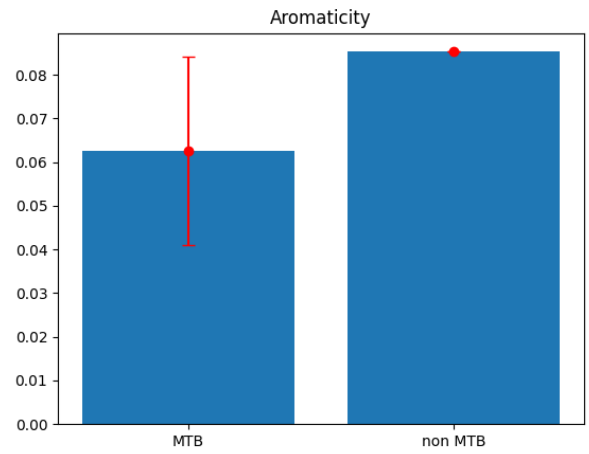
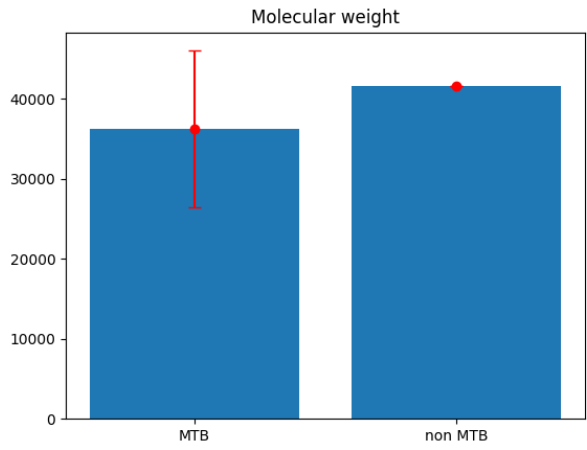


Рис. 3.2 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matB* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Aspergillus flavus*



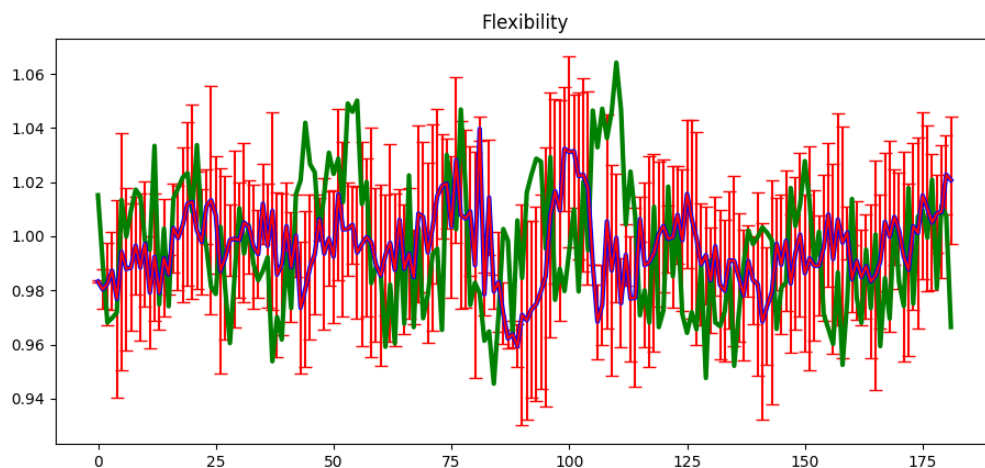
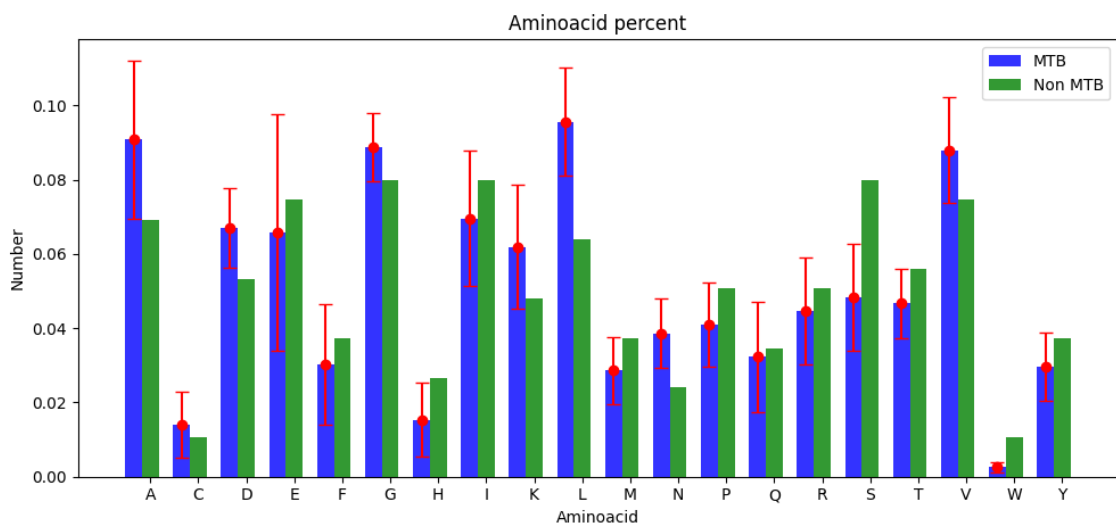
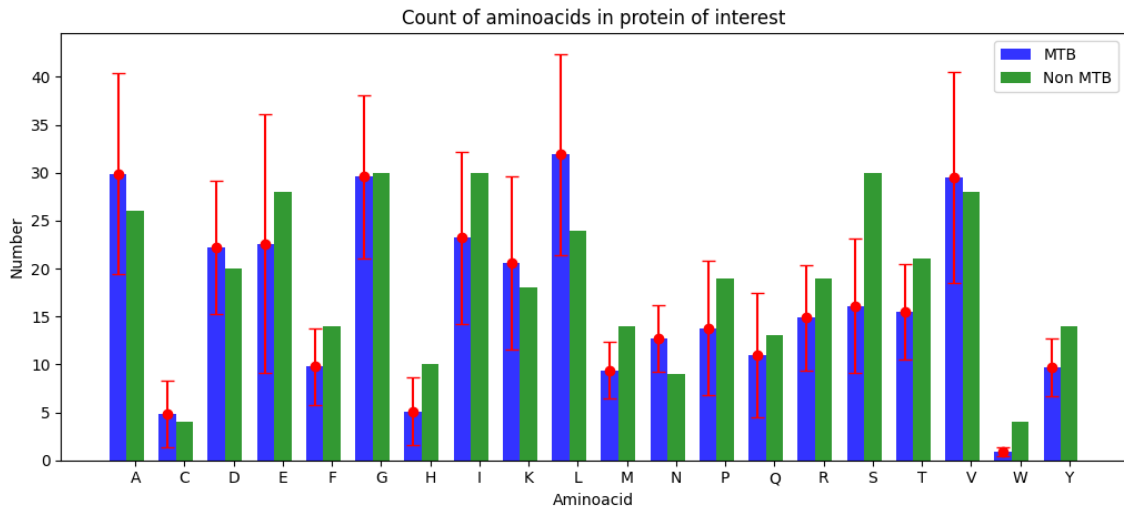
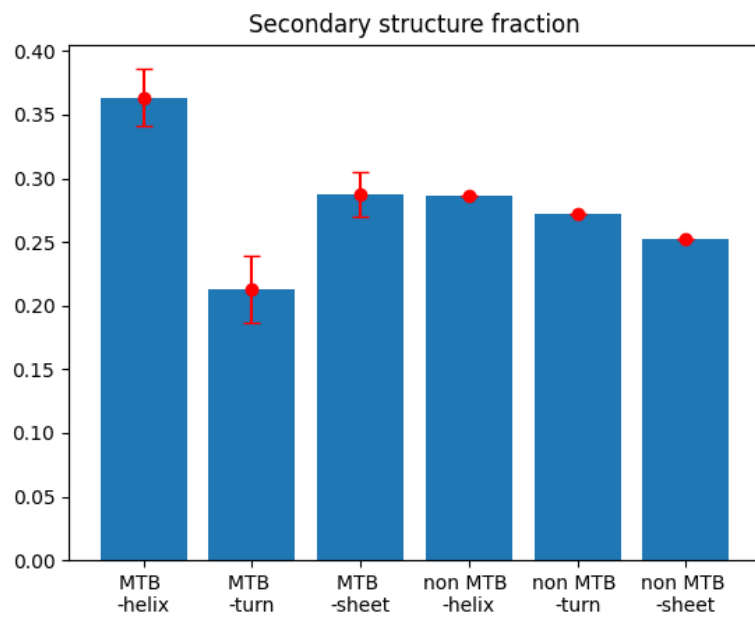
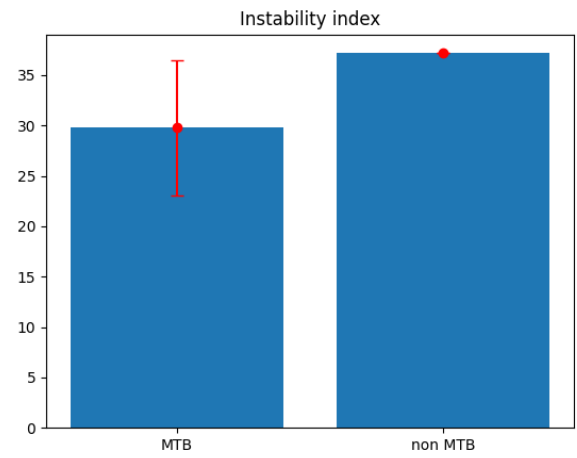
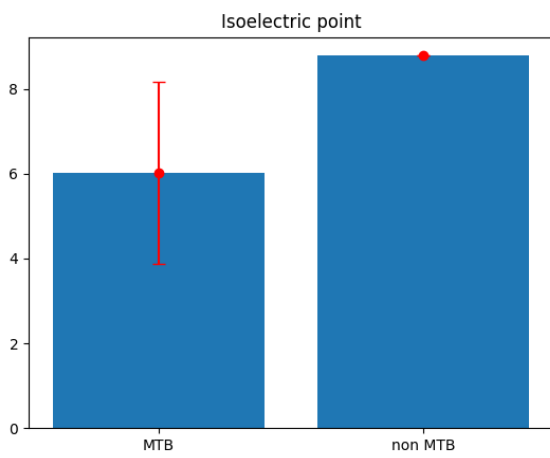
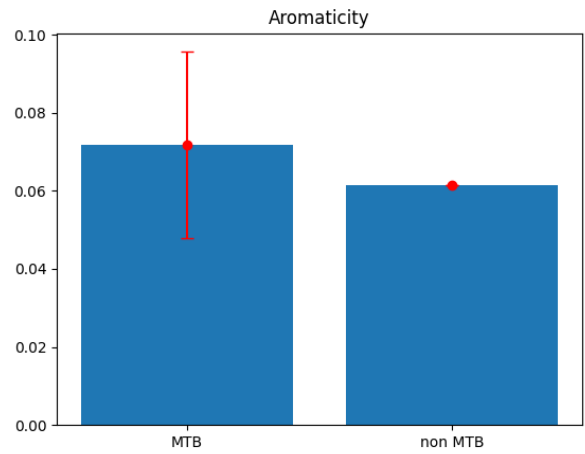
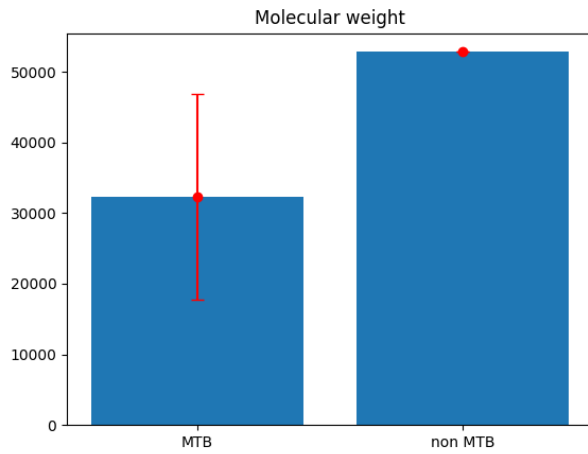


Рис. 3.3 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку matK магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Aspergillus flavus*



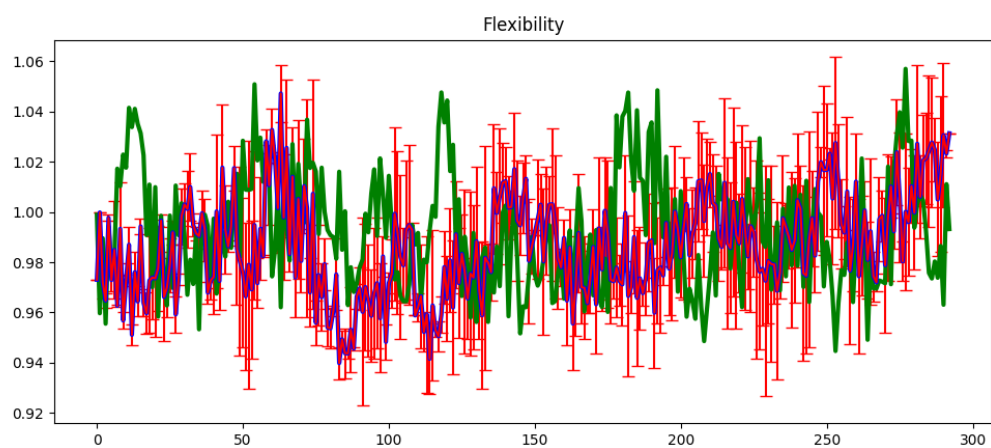
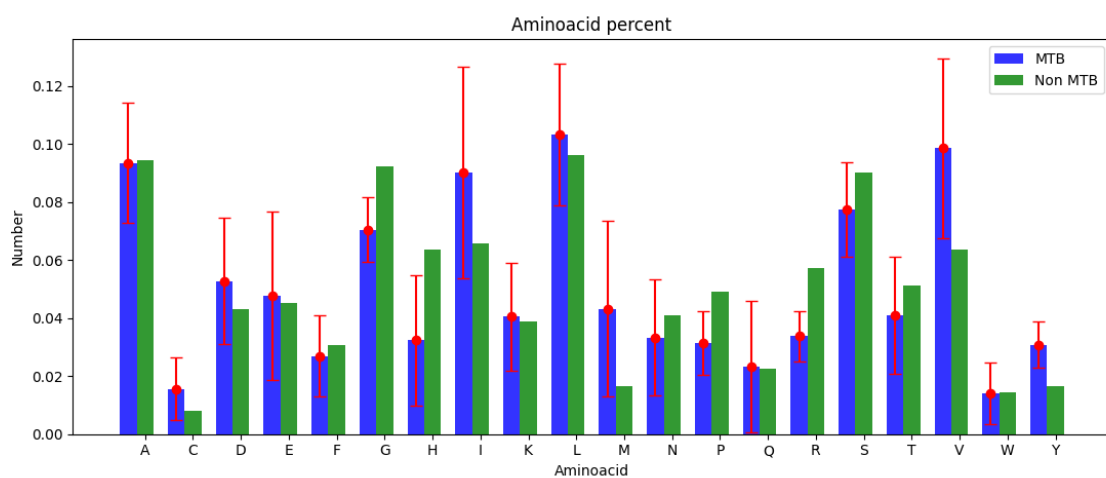
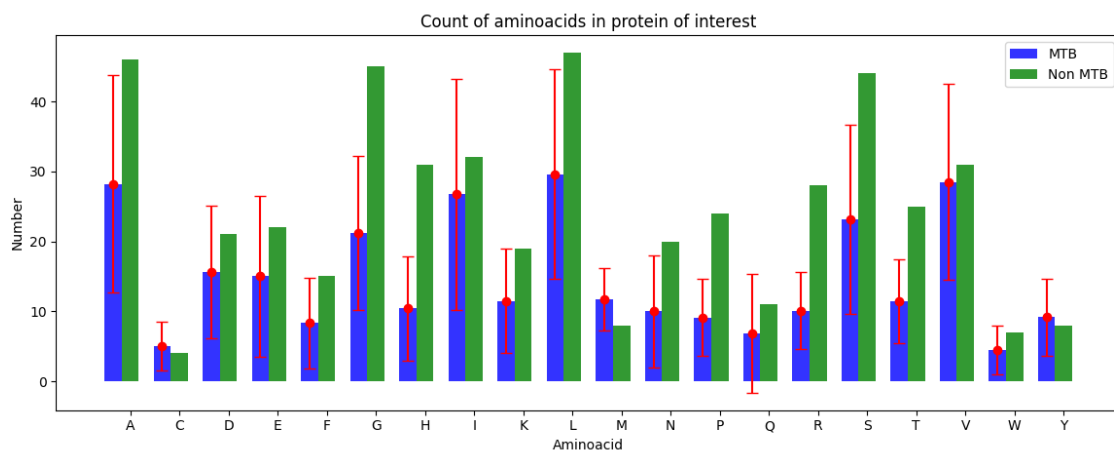
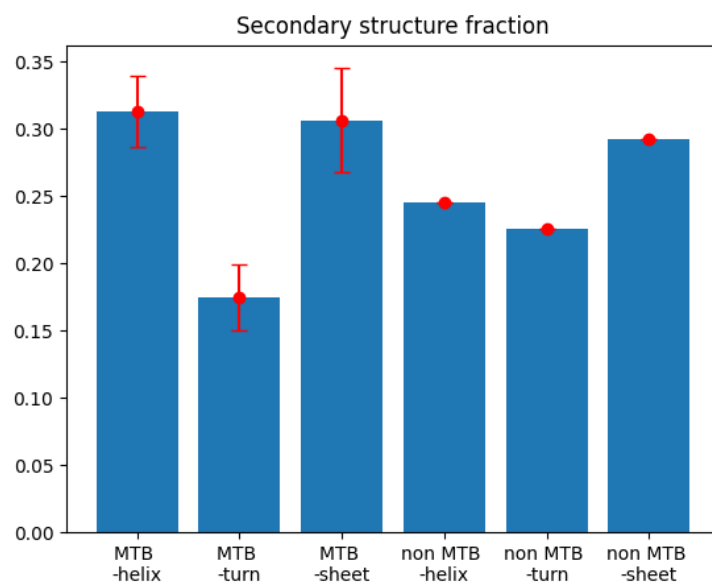
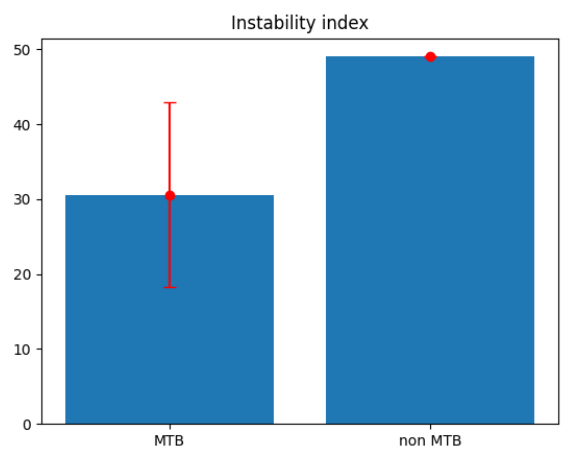
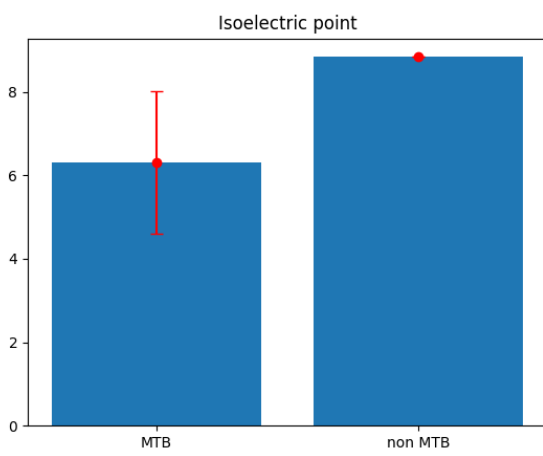
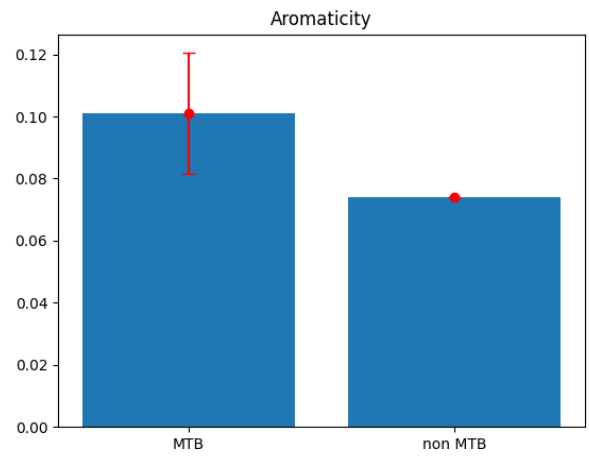
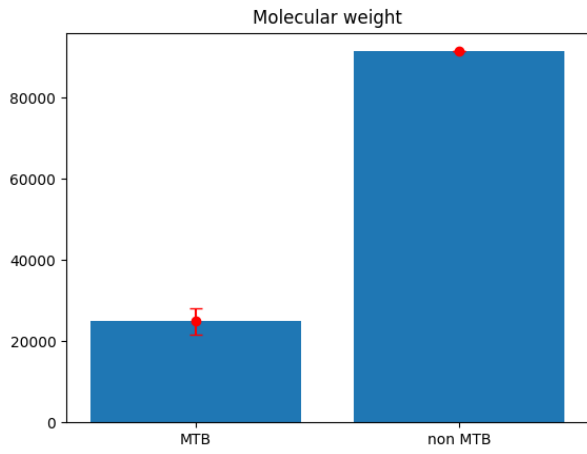


Рис. 3.4 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *tamM* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Aspergillus flavus*



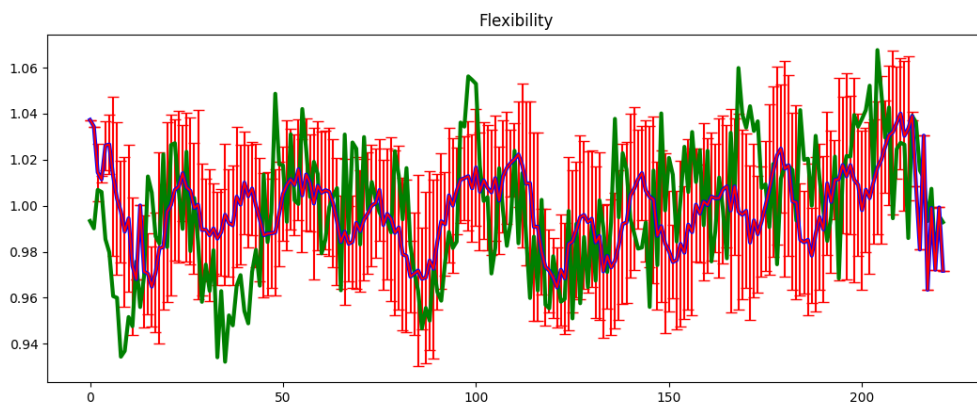
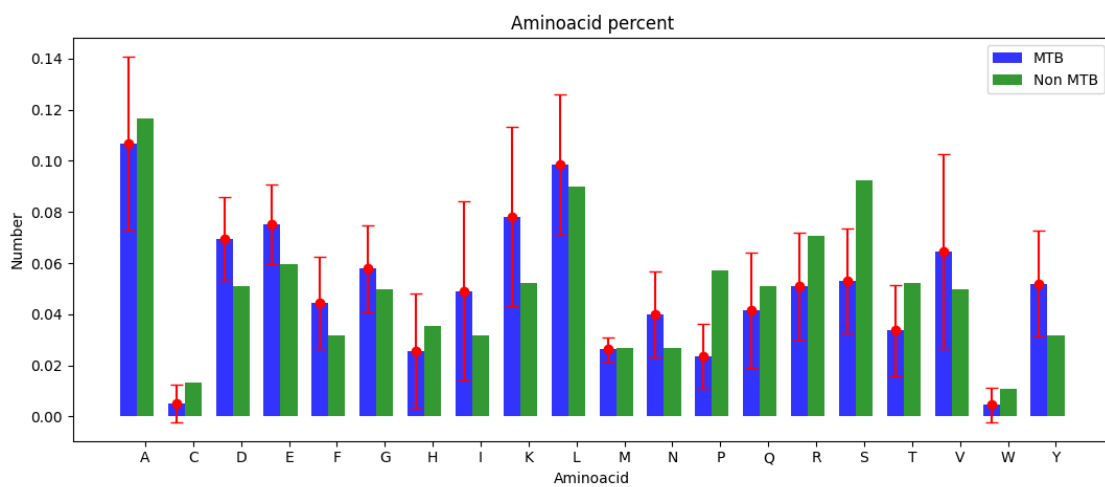
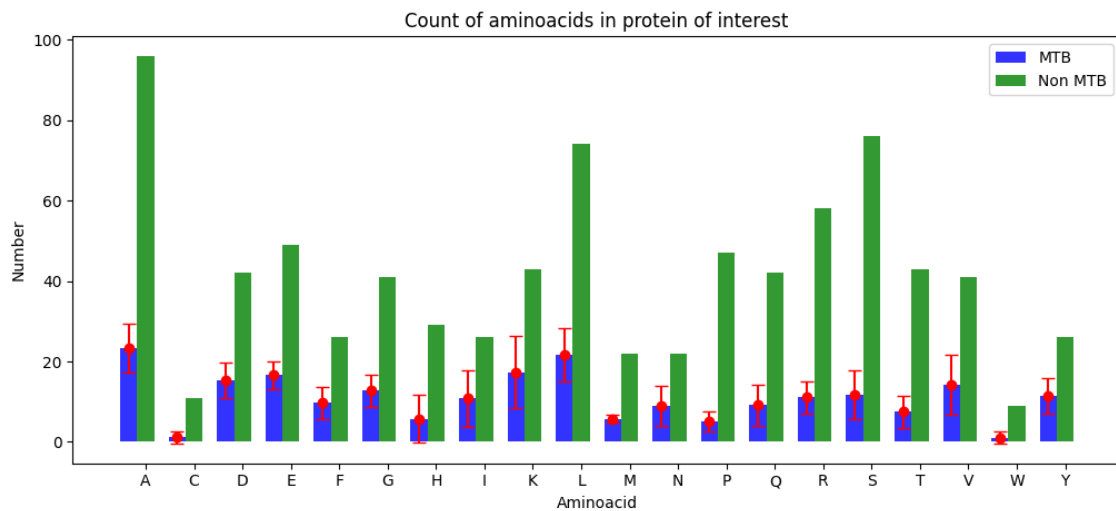
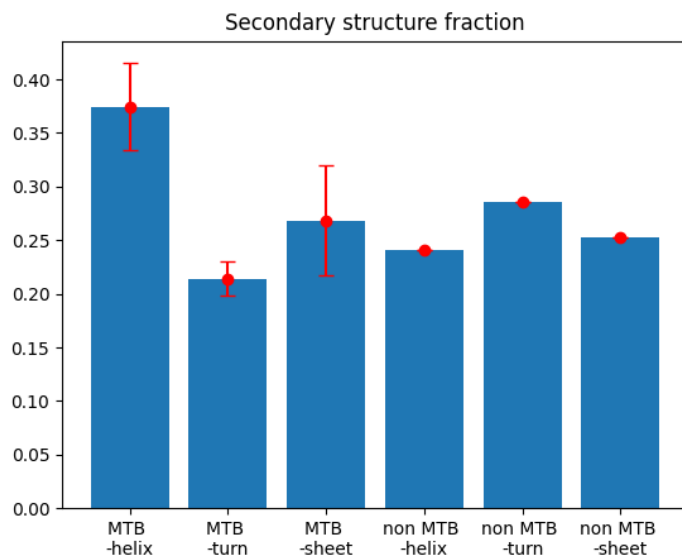
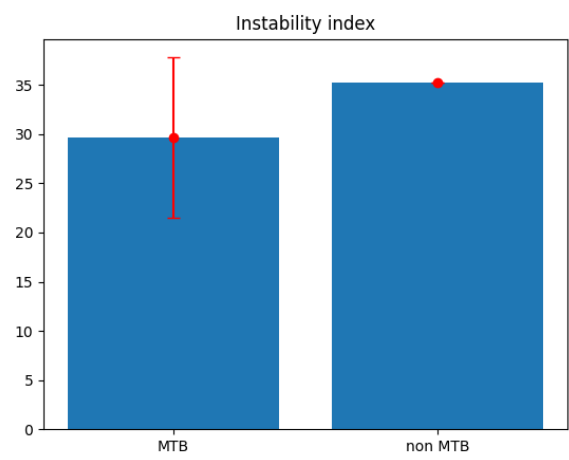
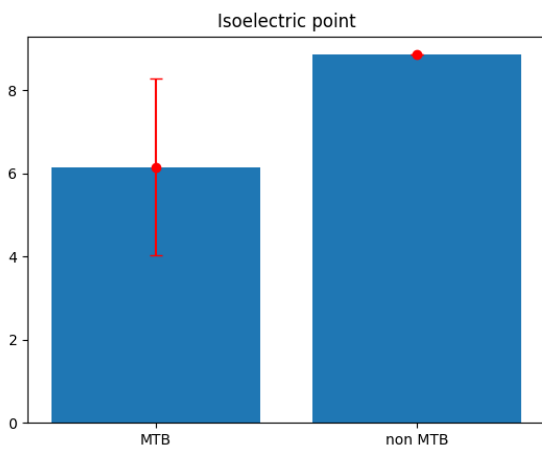
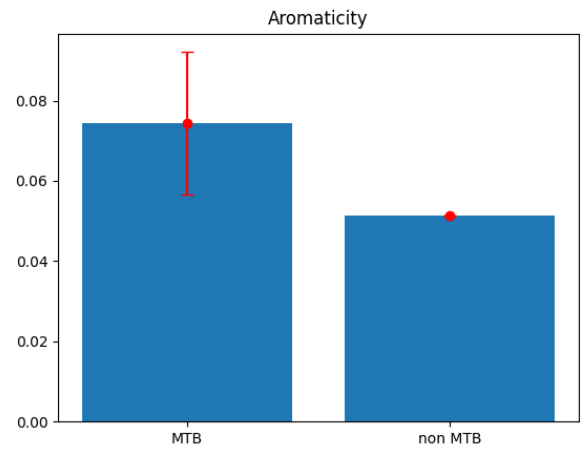
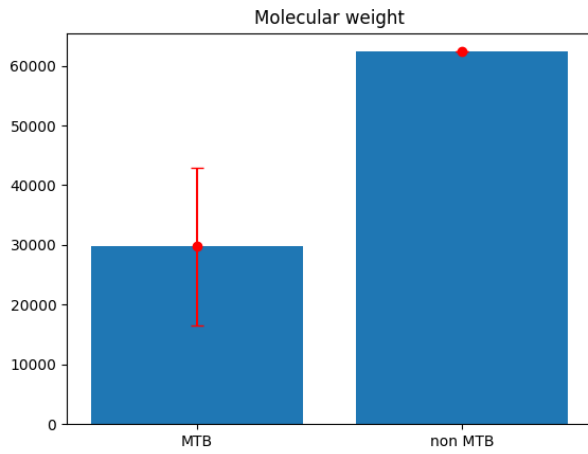


Рис. 3.5 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *tamA* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Fusarium oxysporum*



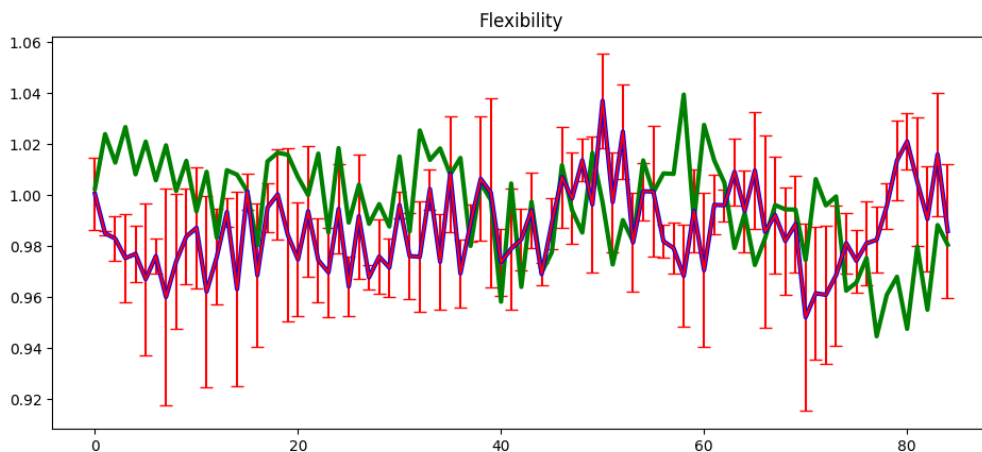
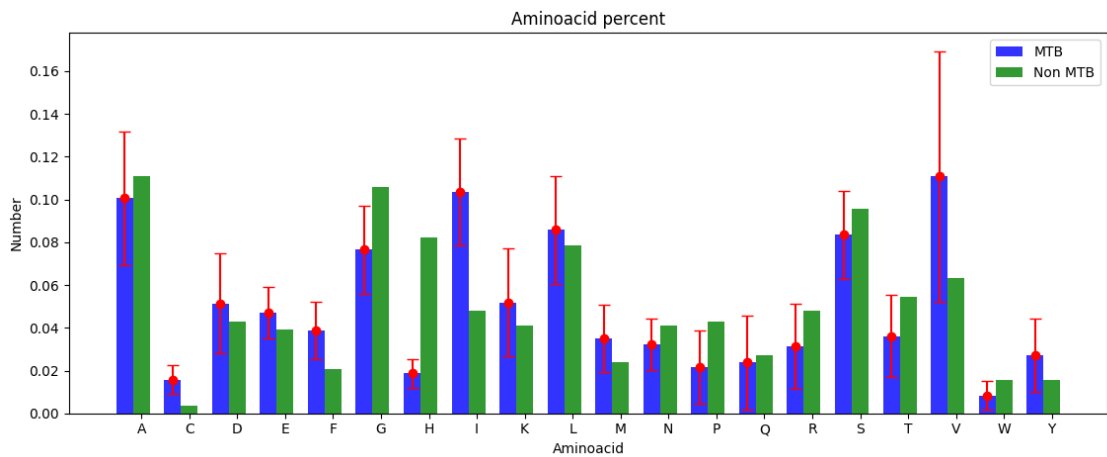
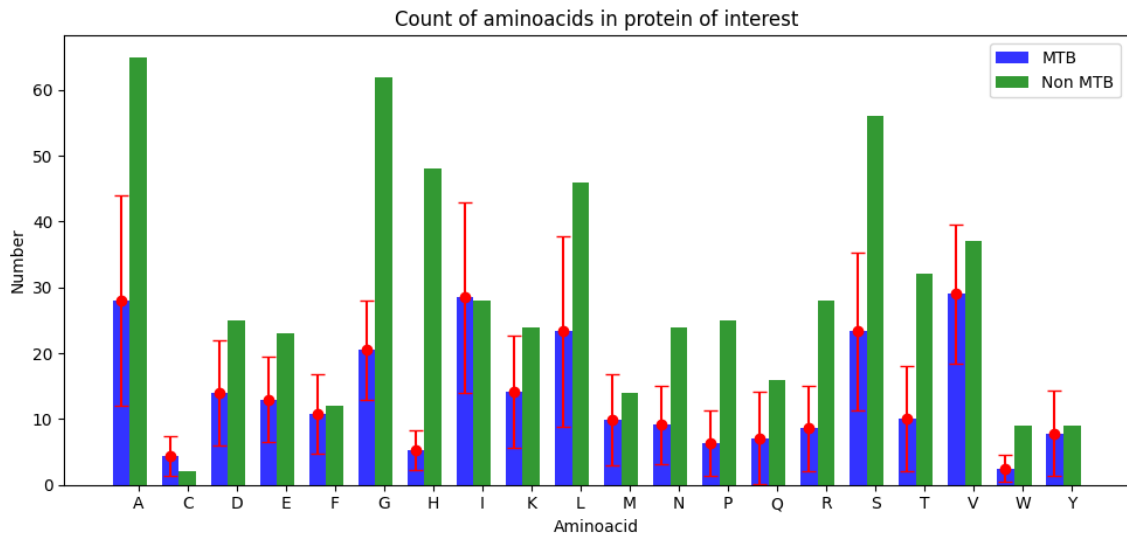
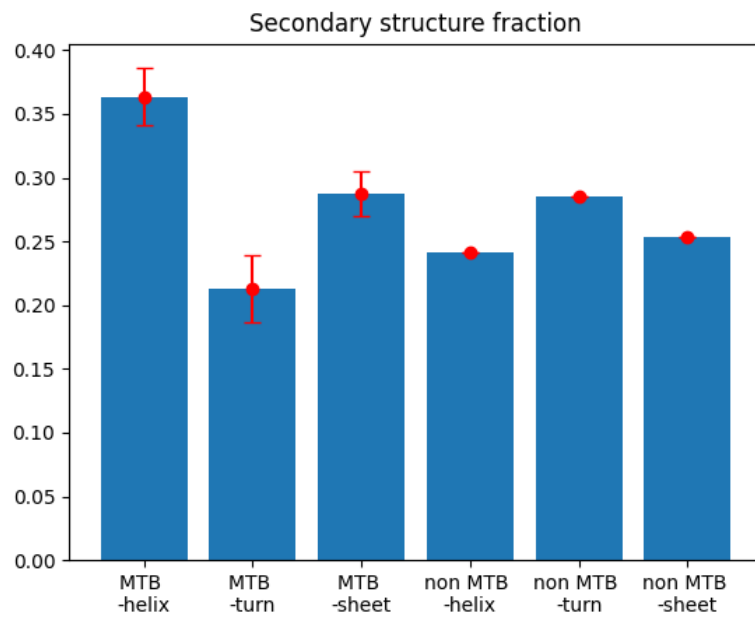
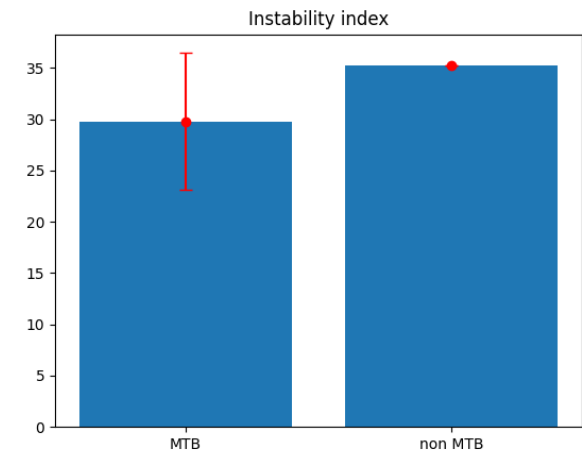
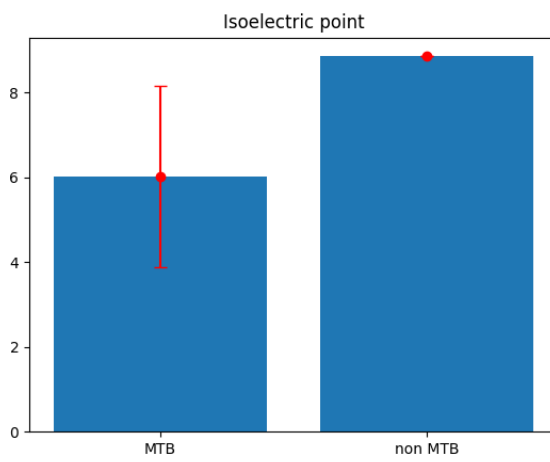
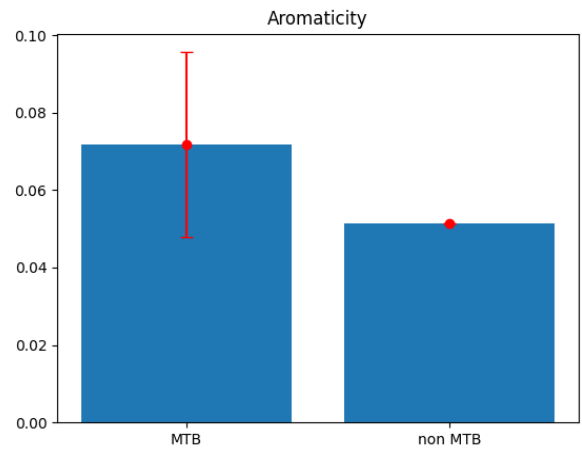
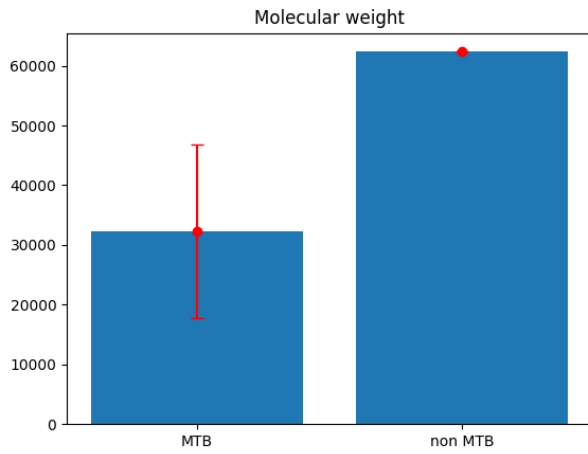


Рис. 3.6 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matB* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Fusarium oxysporum*



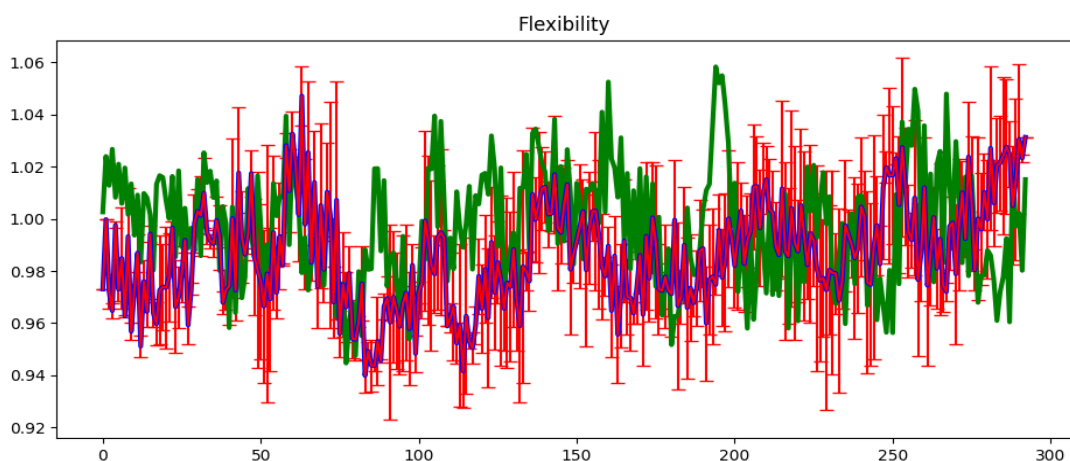
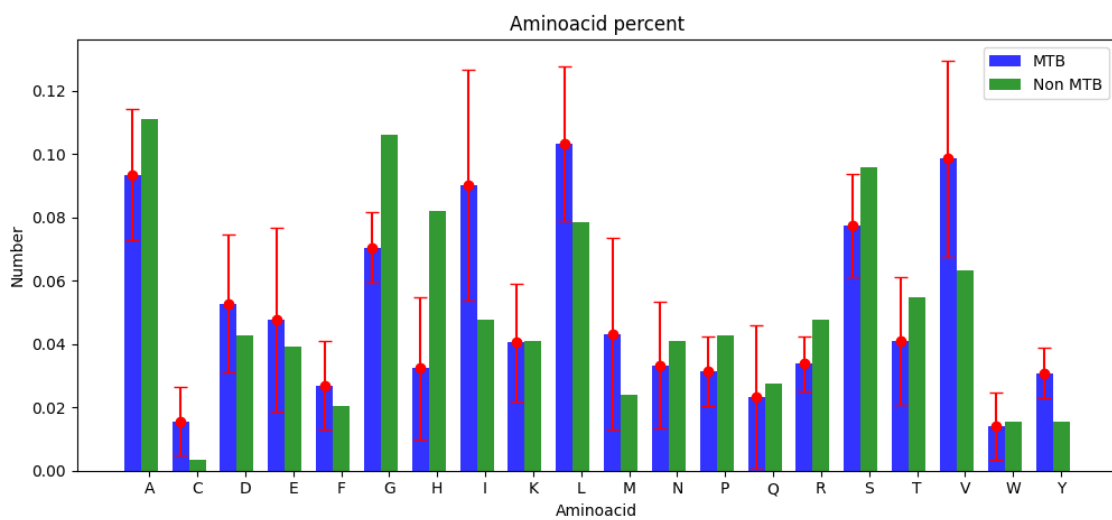
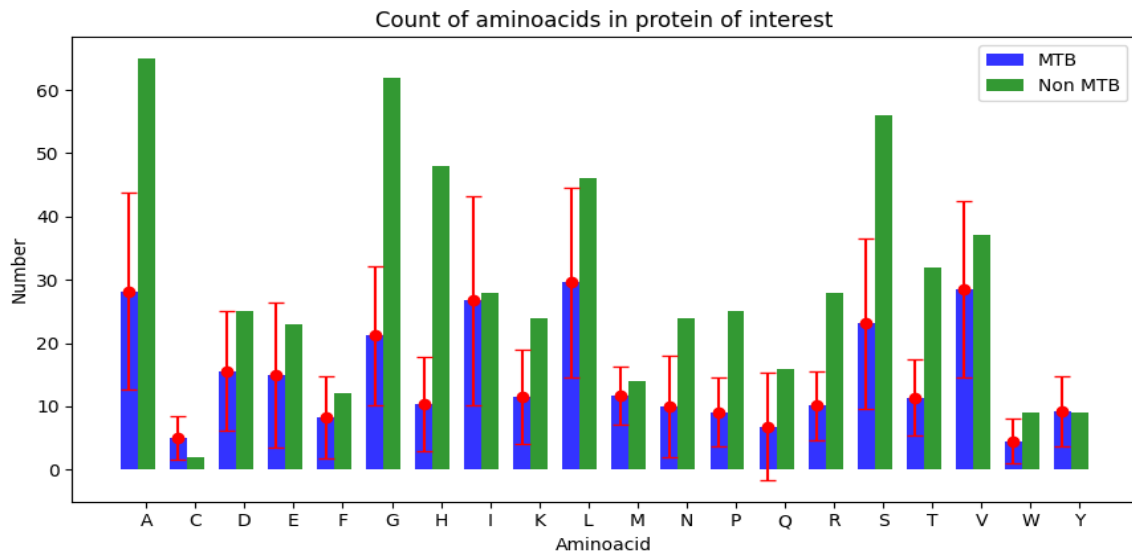
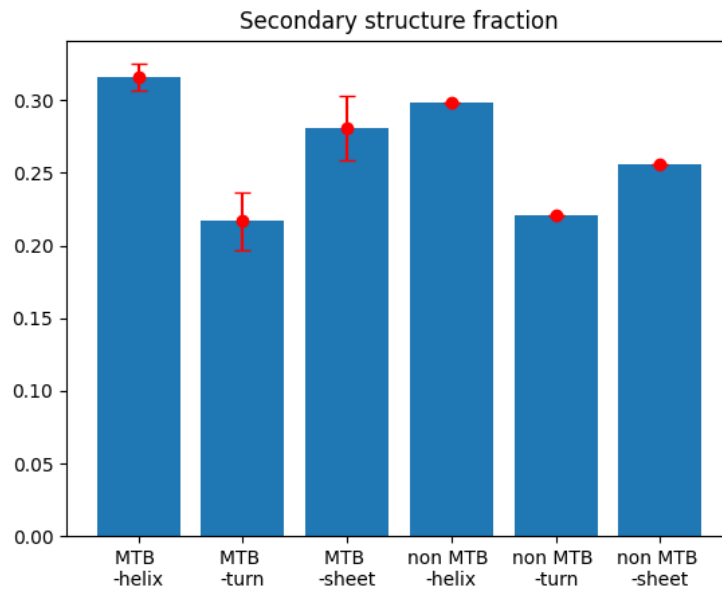
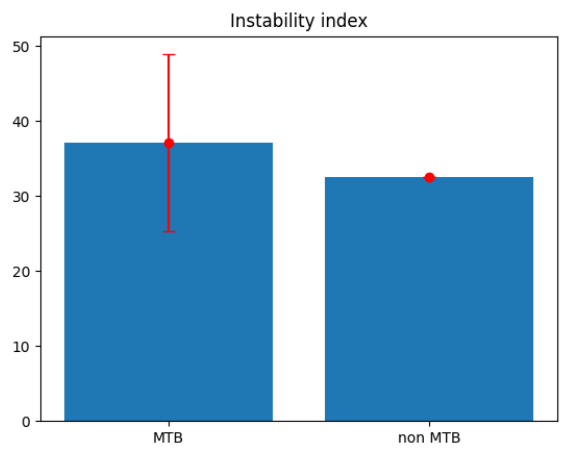
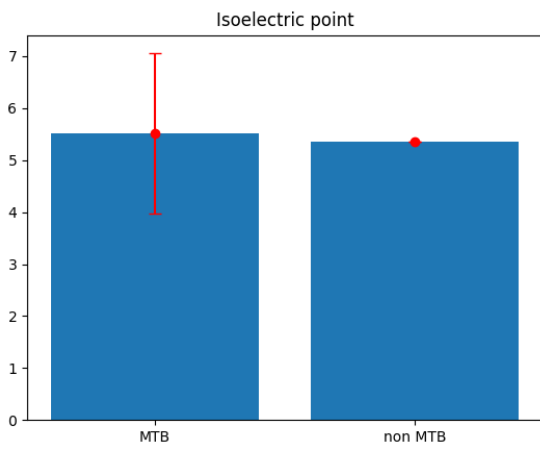
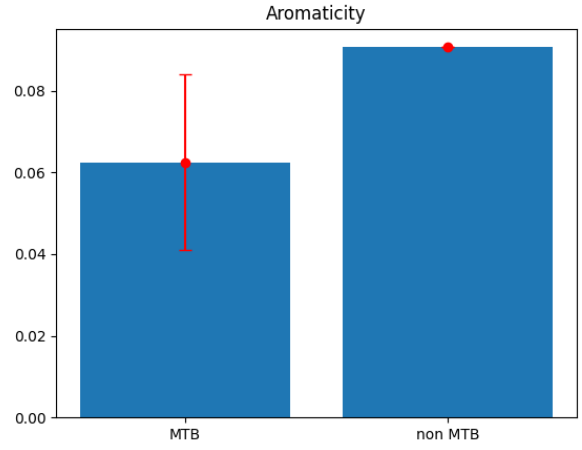
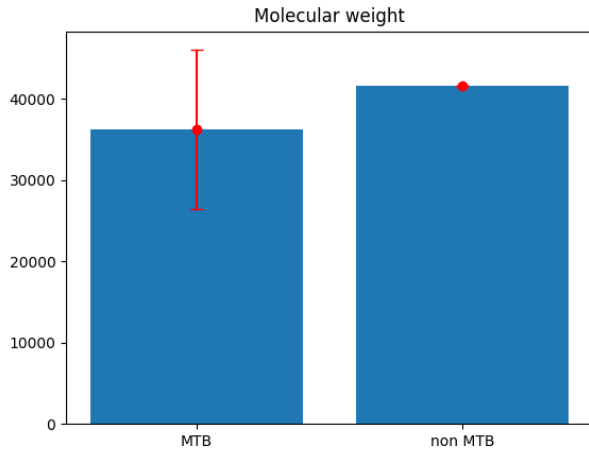


Рис. 3.7 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку matM магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Fusarium oxysporum*



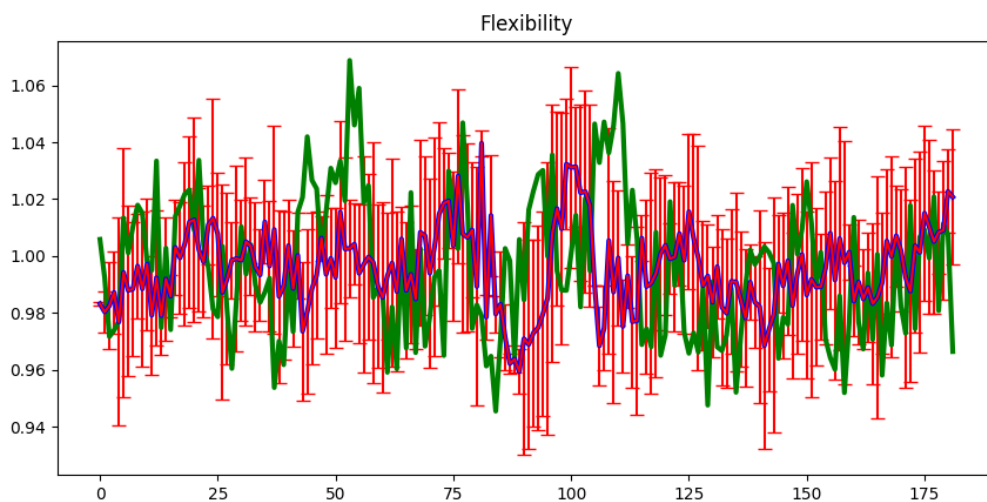
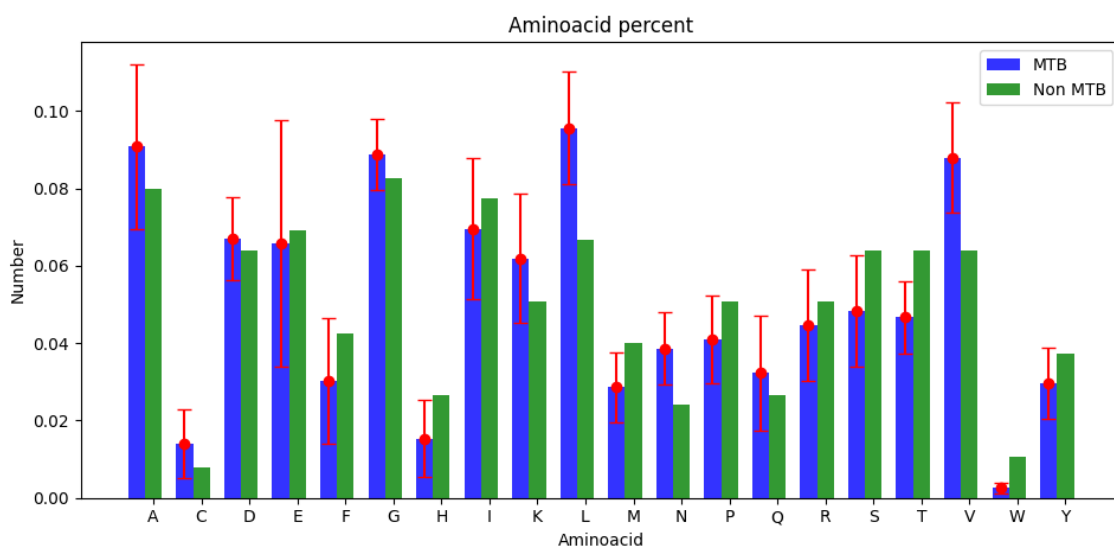
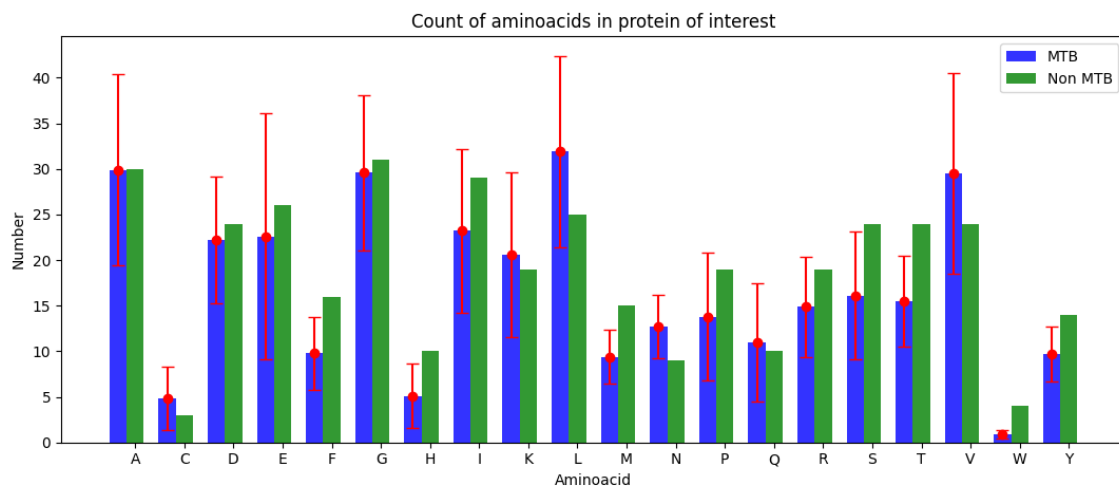
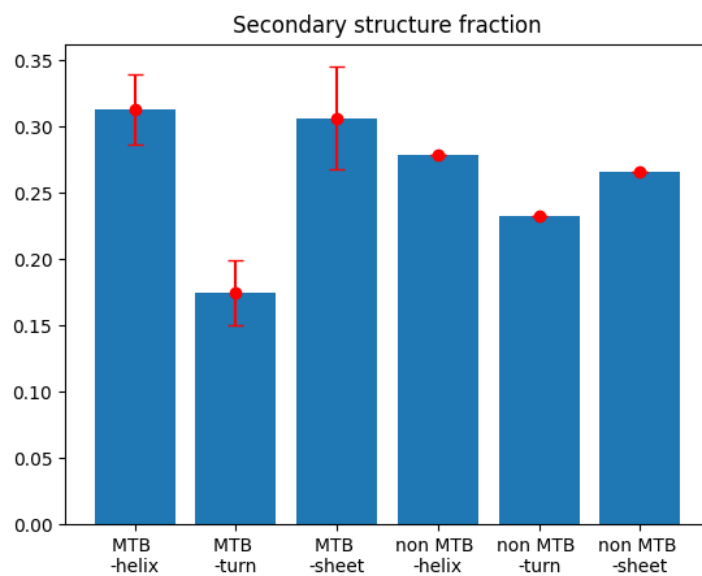
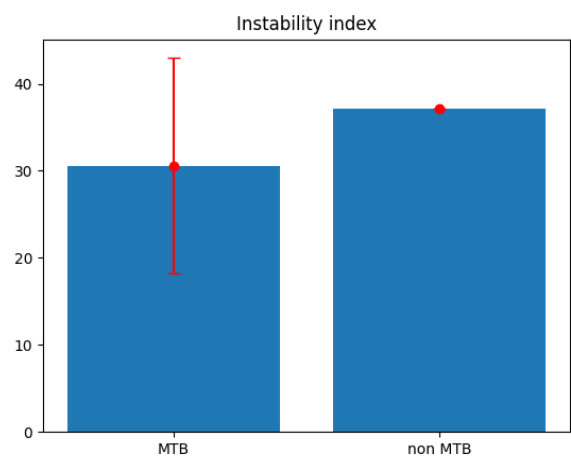
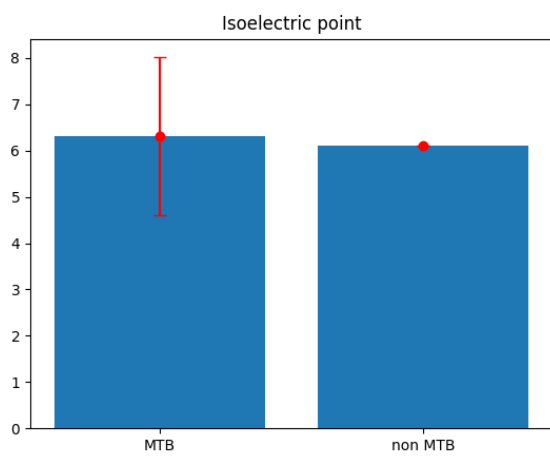
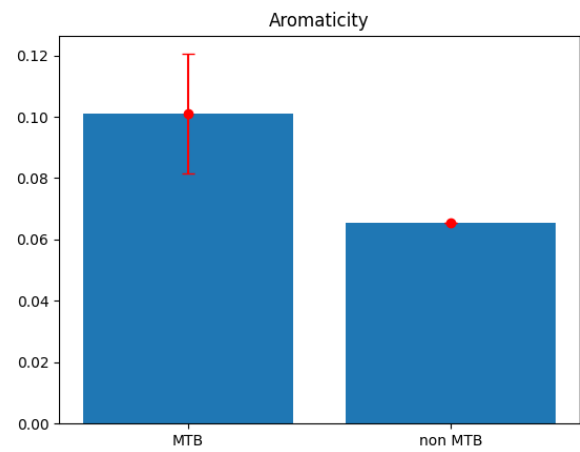
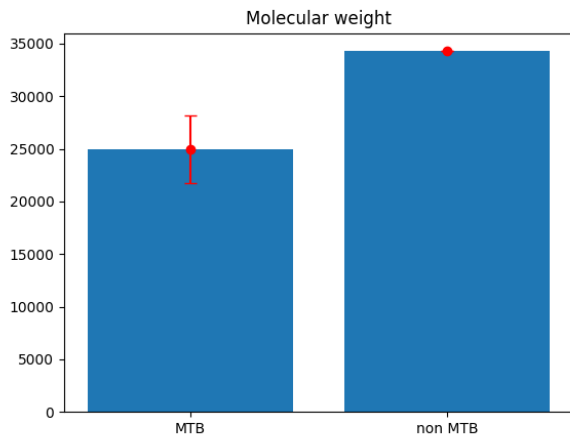


Рис. 3.8 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matK* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Fusarium oxysporum*



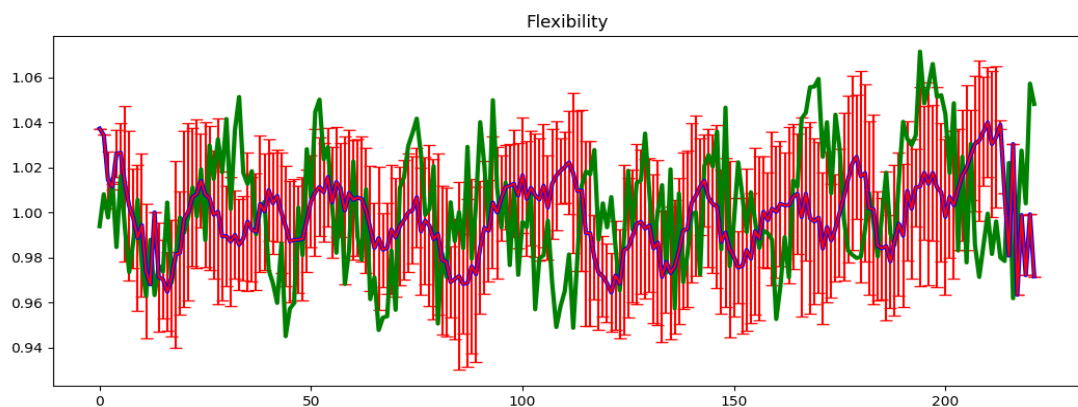
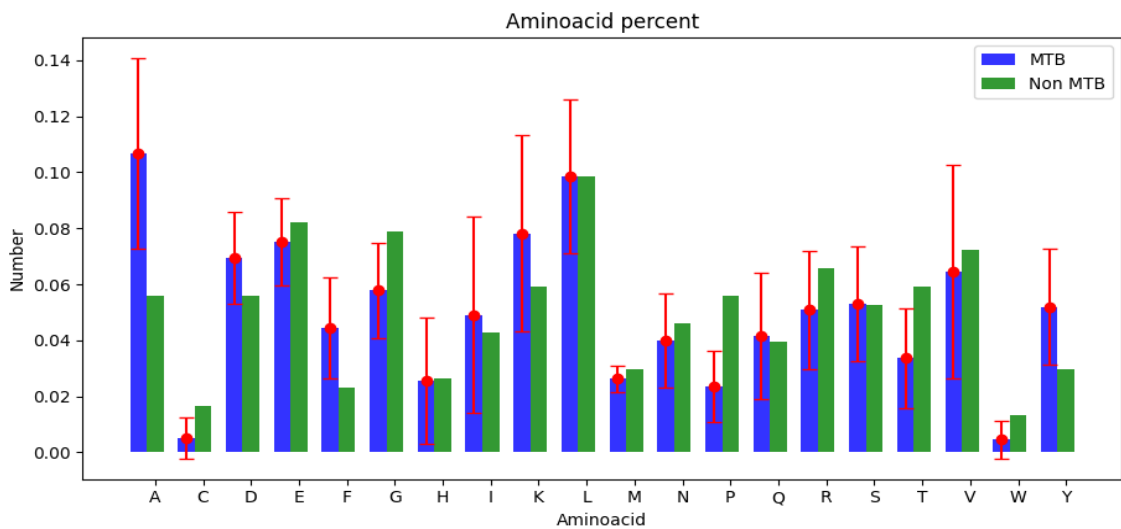
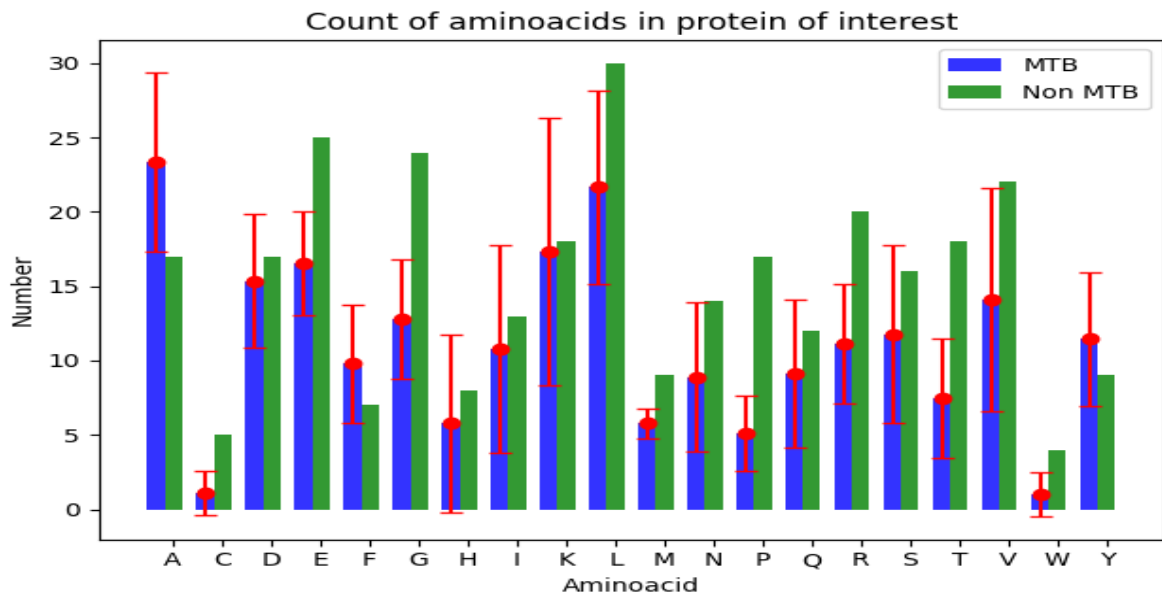
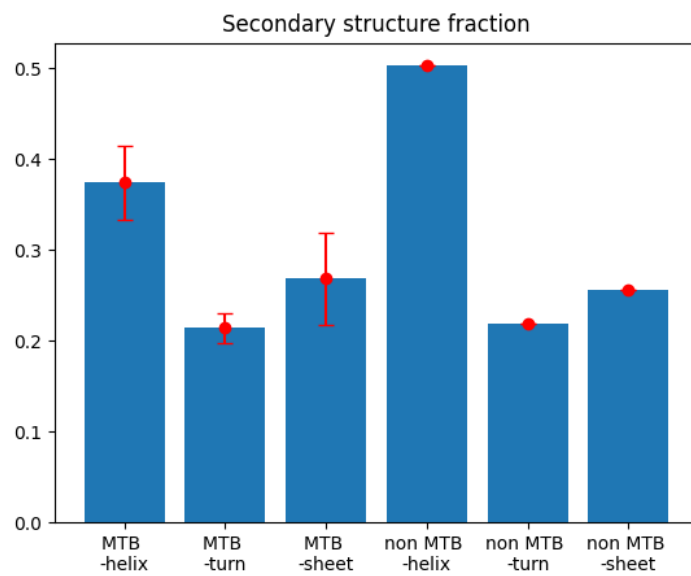
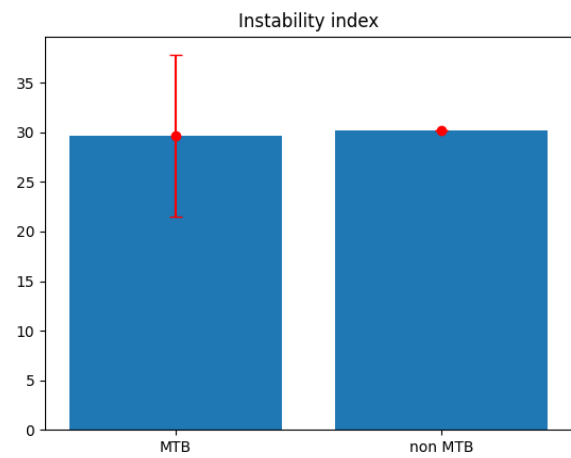
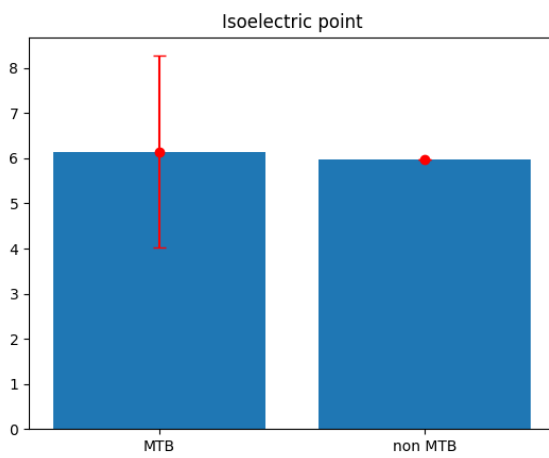
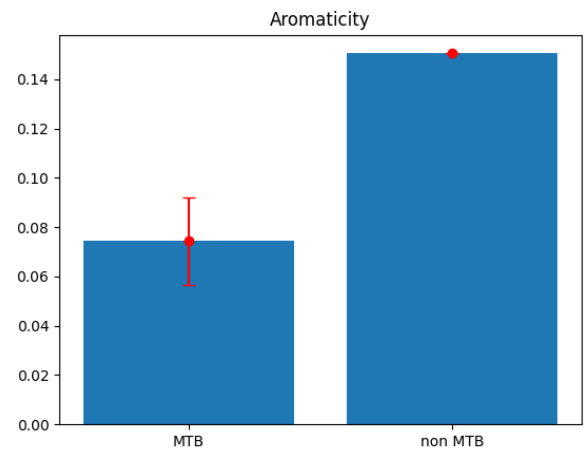
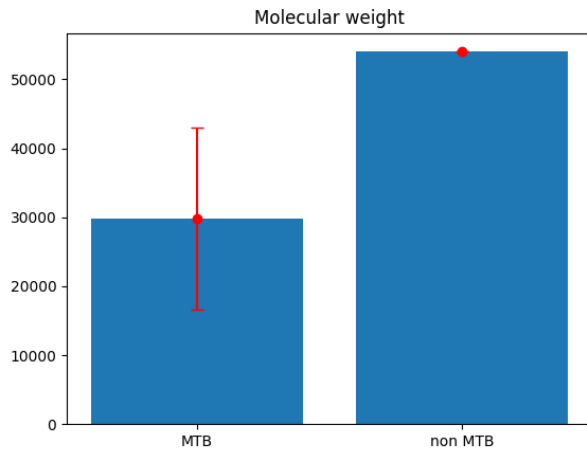


Рис. 3.9 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matA* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Trichoderma hamatum*



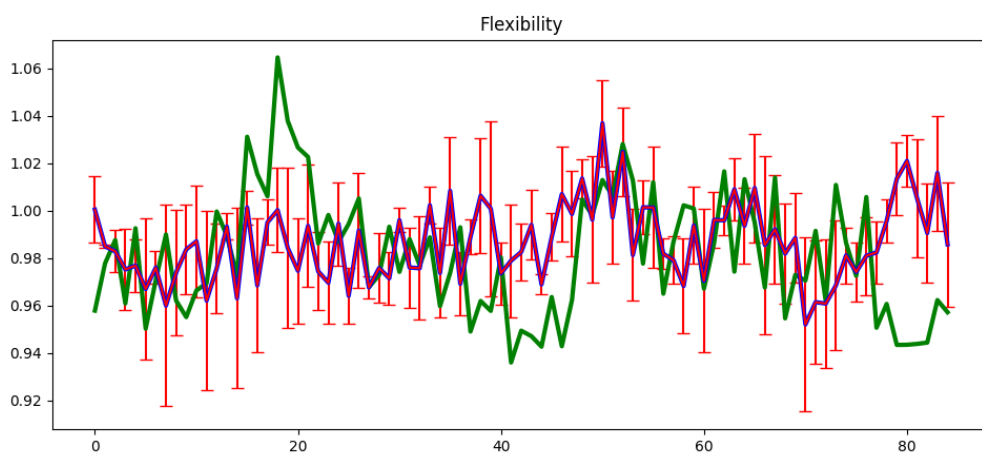
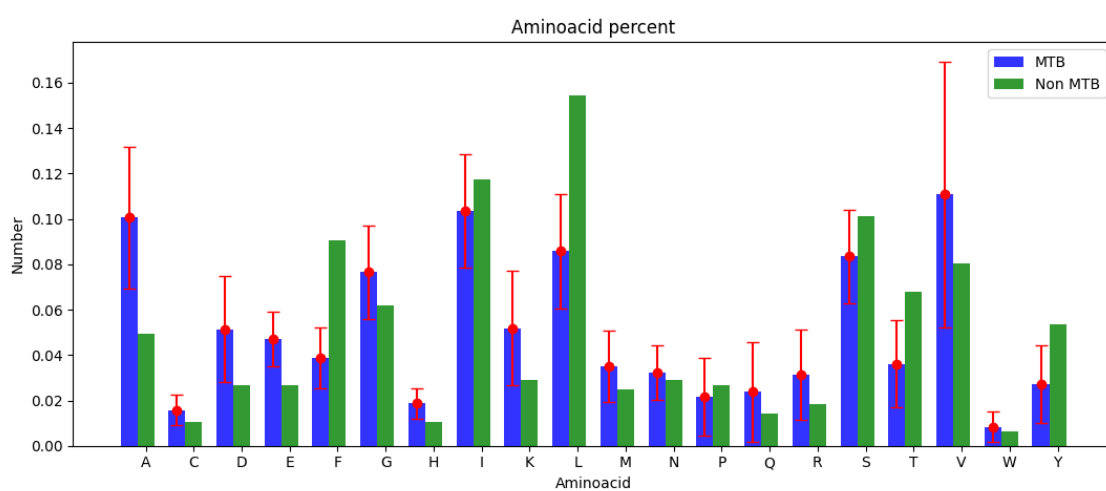
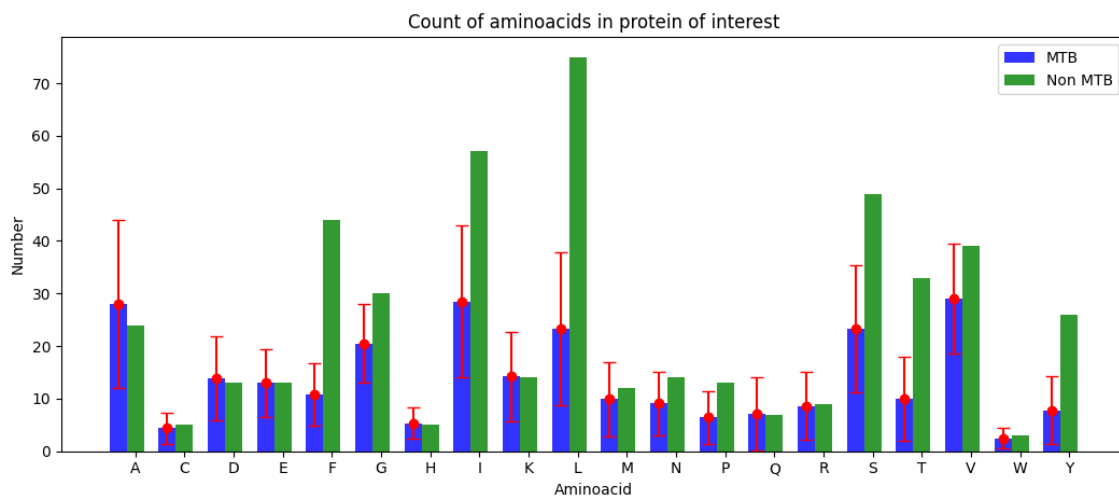
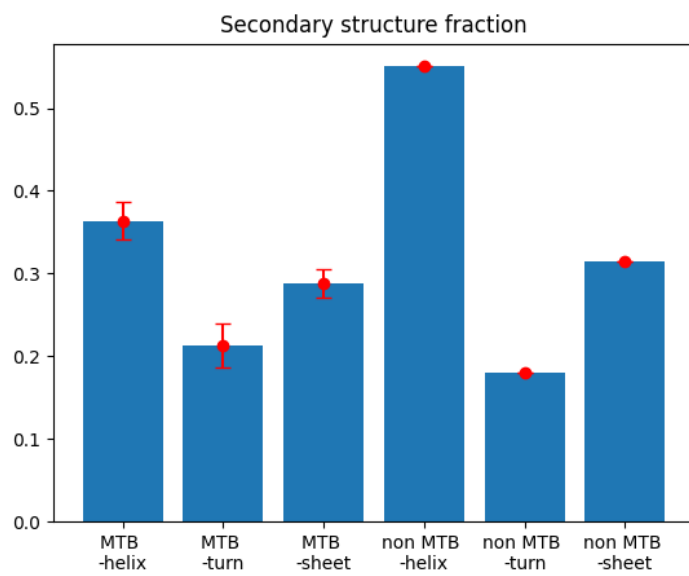
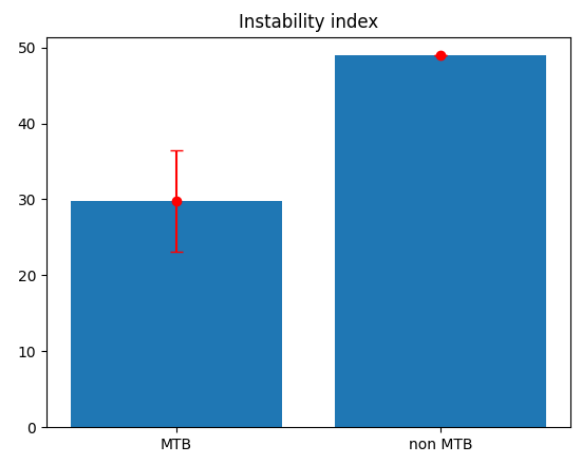
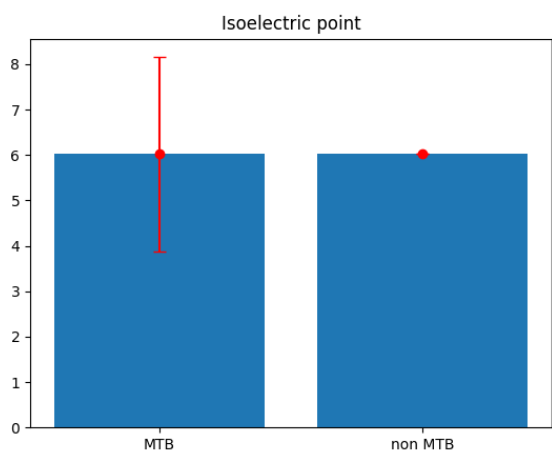
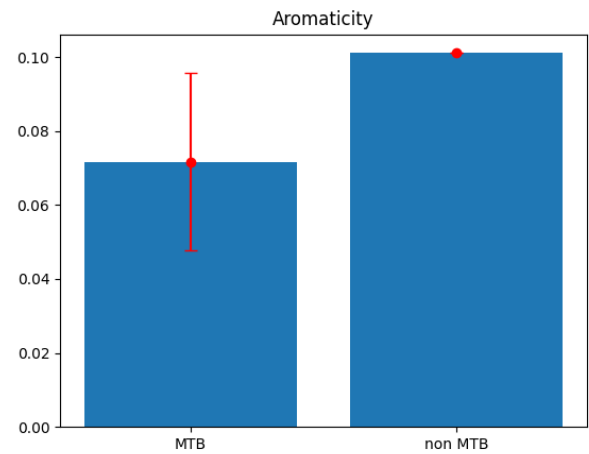
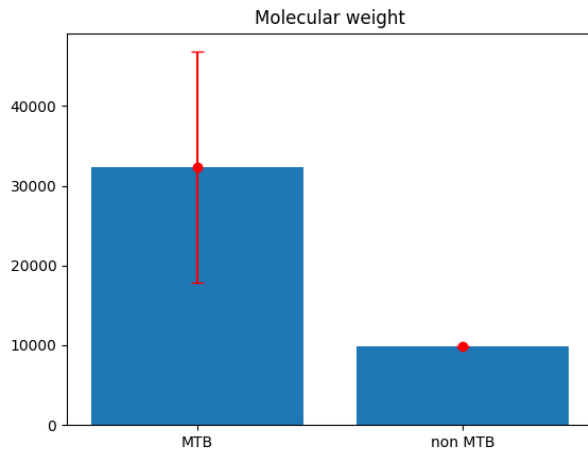


Рис. 3.10 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *tamB* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Trichoderma hamatum*



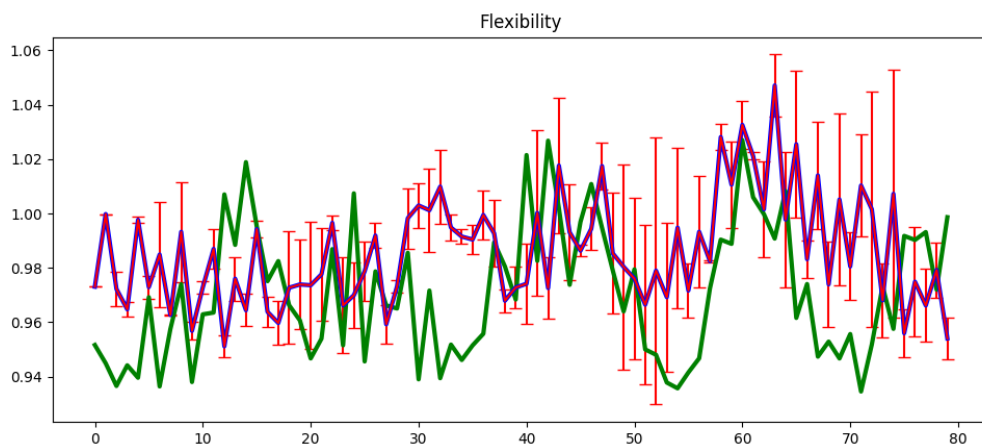
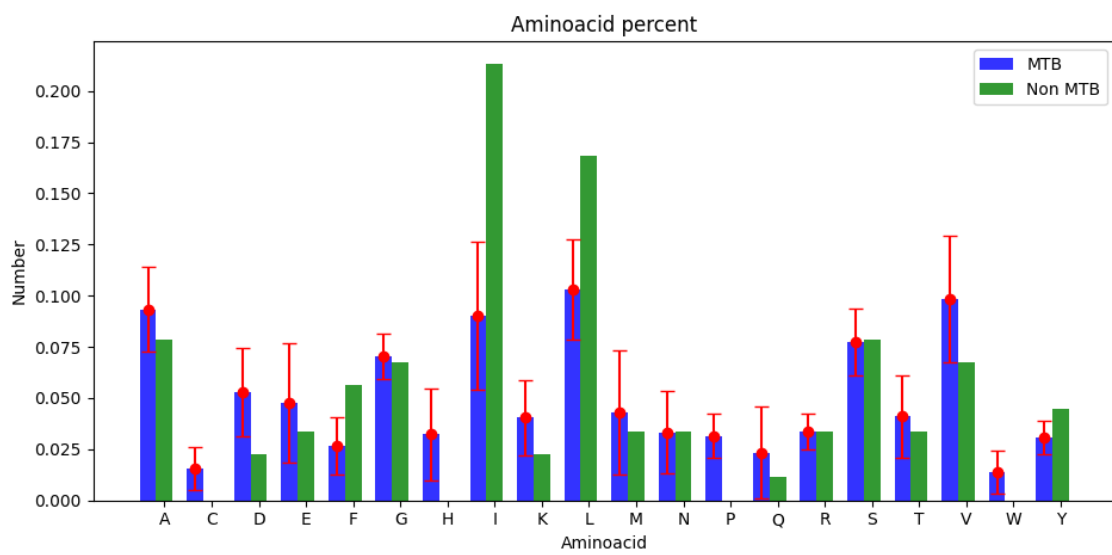
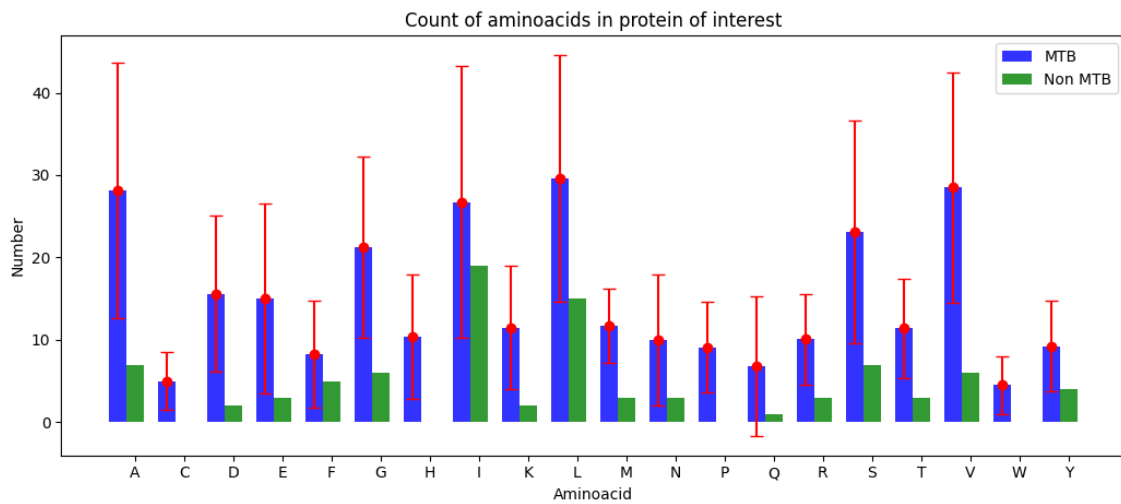
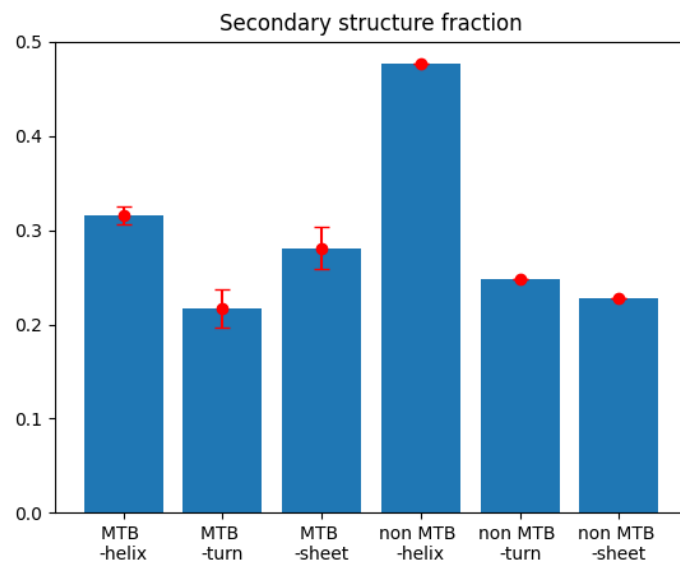
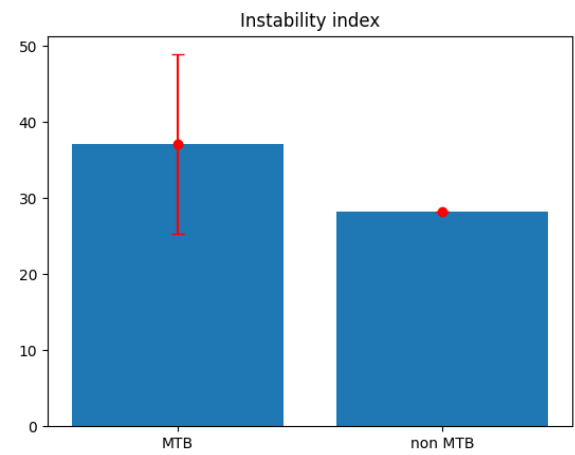
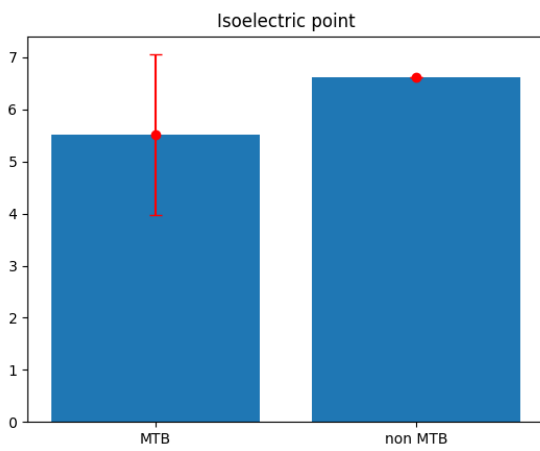
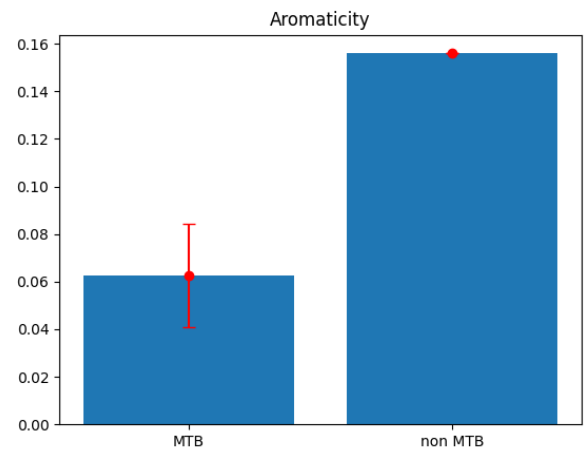
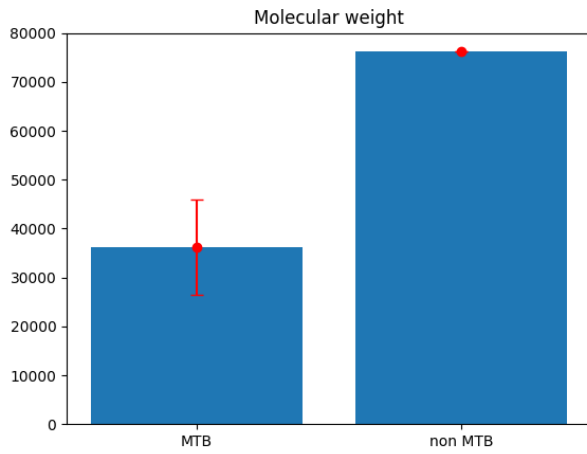


Рис. 3.11 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matM* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Trichoderma hamatum*



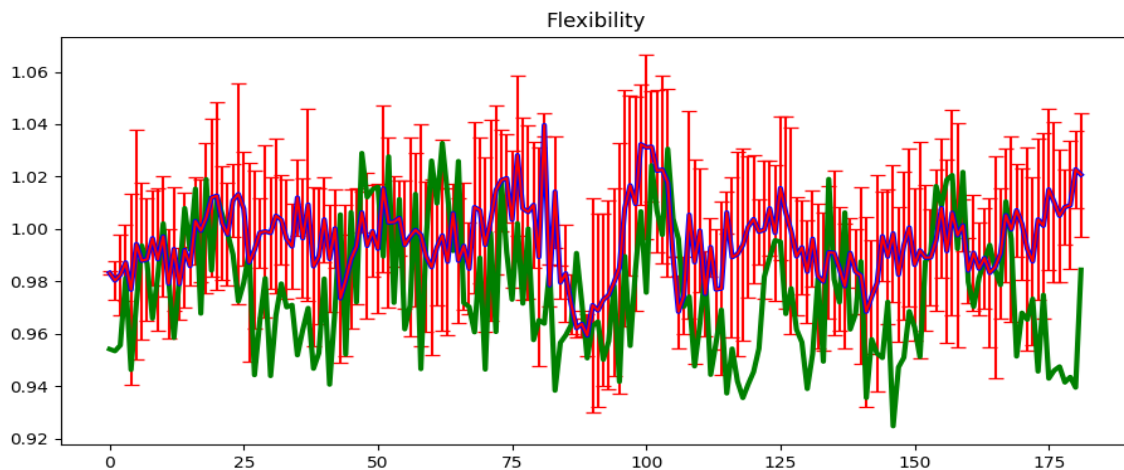
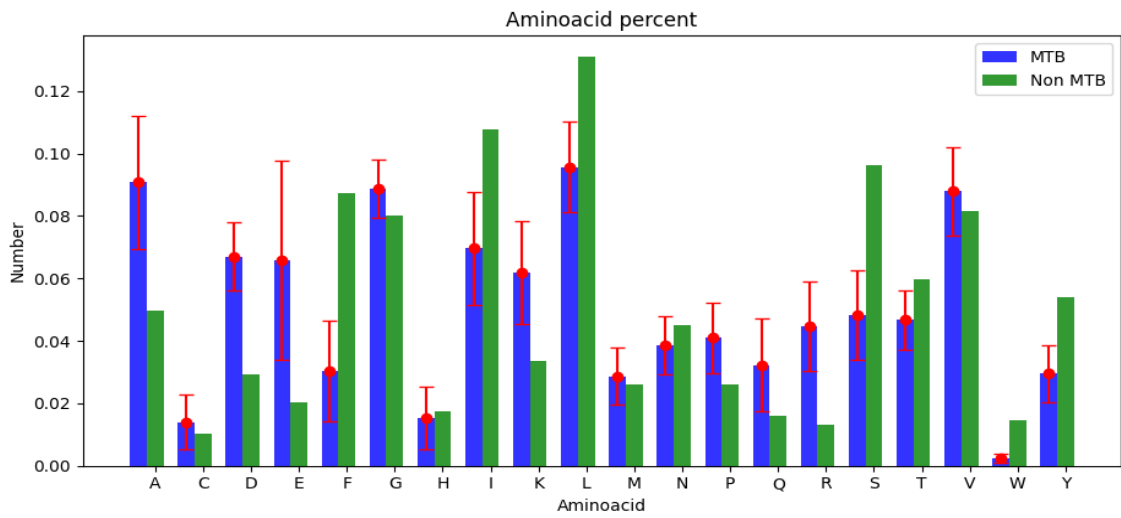
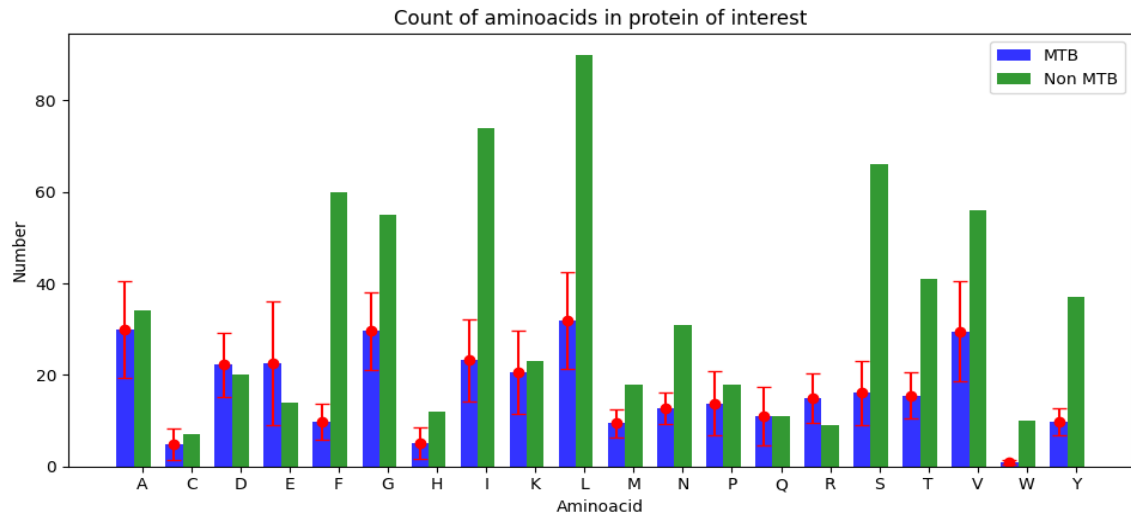


Рис. 3.12 – Графіки порівняння фізико-хімічних властивостей білку *matK* магнітосомного геномного кластера МТБ та його білкового гомологу магнітосомного кластера у протеомі *Trichoderma hamatum*

3.2 Обговорення результатів

Наявність гомологів білка MamB і MamM-МТВ є необхідною умовою для синтезу всіх типів БМН, оскільки ці білки відповідають за транспортування катіонів металів та ініціацію процесу біомінералізації. Гомолог білка MamA відповідає за формування кристалічної структури БМН, а за його відсутності порушується просторова організація комплексів важливих білків біомінералізації у мембранах магнітосом, що призводить до накопичення аморфного БМН. Гомологи серинових протеаз MamO і MamE, які є трансмембранними білками, необхідні для утворення внутрішньоклітинних БМН, оскільки вони забезпечують розміщення іонних каналів, транспортерів і рецепторів залізовмісних сполук у мембранах магнітосом у правильній необхідній просторовій орієнтації для біомінералізації. Гомолог білка MamK відповідає за утворення пов'язаних з мембраною ланцюгів БМН. Проведений біоінформаційний аналіз показав, що гени біомінералізації БМН були знайдені у всіх досліджених вище мікрогрибах, чий геноми були розшифровані на 25% або більше в базі даних GenBank NCBI.

До синтезуючих зовнішньо-клітинні кристалічні БМН (mamA+mamB+mamM) серед грибів, можуть відноситися лише ті, у яких значення E-value менше 0.05, ідентичність більше 18% і довжина вирівнювання більше 100 амінокислотних залишки.

Гомологію підтверджує не тільки E-число та кількість ідентичних амінокислотних залишків білків (Ident), а і функції білків грибів, які гомологічні білкам МТВ *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, без яких неможлива біомінералізація БМН (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Порівняння функцій білків біомінералізації у МТБ та гомологічних білків у грибів

Назва білку МТБ	Функції білку МТБ	Назва та функції гомологічного білку грибів
MamA	Містить домен TPR, який вродженою послідовністю з ~34 амінокислот із слабкою основою, домен якої виконує різні функції, такі як білок-білкові взаємодії, функції шаперонів, клітинний цикл, білковий транспорт, транскрипцію [54]	TPR-подібний білок; APC/C – білок, що відіграє ключову роль у процесі розмноження еукаріотичних клітин, а також у видаленні пошкоджених білків з клітини. CDC23 protein – є білком, необхідним для прогресування клітинного циклу через перехід G2/M. Цей білок є компонентом комплексу, сприяє анафазі (APC), який складається з восьми білкових субодиниць і добре зберігається у еукаріотичних клітинах. APC каталізує утворення кон'югату цикліну В-убіквітину, який відповідає за убіквітин-опосередкований протеоліз циклінів В-типу, містить домен TPR.
MamB	Транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni.	(CDF) Cation efflux family protein – інтегральні мембранні білки, які підвищують толерантність до іонів двовалентних металів, таких як кадмій, цинк і кобальт [55].
MamM	Транспортер катіонів Co, Zn, Cd, Fe, Ni.	(CDF) Cation efflux family protein – сімейство мембранно-зв'язаних білків, здатних транспортувати іони цинку та

		інших важких металів. Беруть участь у толерантності/резистентності до металів шляхом витоку іонів [55]
MamK	Актин-подібні білки	Актин – білок, що експресується всіма типами клітин; високі концентрації актину та унікальні ізоформи допомагають зробити актин маркером диференціювання м'язів [56].

Біогенні магнітні наночастинки на основі Fe та Co (БМН) мають різні біологічні застосування, включаючи діагностику та лікування, розділення, імунологічний аналіз, доставка ліків в очі та мозок, наноносії ліків, доставка генів та магнітно-резонансна томографія. Крім того, багато дослідників розглядали та розробляли використання магнітних наночастинок у лікуванні раку за допомогою гіпертермії, яка є альтернативою радіотерапії та хіміотерапії. Наночастинки мають сучасні технології, а також різні корисні застосування в медицині.

Дослідження показали, що гриби відділу аскоміцети у більшості своїй беруть участь у синтезі таких металів як срібло та золото. Серед проаналізованих представників відділу аскоміцети було знайдено лише одного представника, який використовується для виробництва кобальту.

Представники роду *Cladosporium* мають незадовільні показники E-value, Ident, length, що є ключовими для визначення їх здатності до продукування БМН. Літературний огляд також не показав можливості їх використання для синтезу наночастинок.

Обидва проаналізованих представники виду *Fusarium* показали позитивні результати як при здійснюванні вирівнювання, так і у процесі

літературного огляду і продемонстрували здатність до синтезу наночастинок металів.

Деякі представники роду *Trichoderma* мали задовільні результати вирівнювань і продемонстрували здатність до синтезу срібла та золота, а саме *Trichoderma virens* Gv29-8, *Trichoderma parareesei* CBS 125925, *Trichoderma guizhouense*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma arundinaceum*.

Найкращі показники спостерігались у представників роду *Penicillium*, які найбільш широко використовуються для виробництва наночастинок таких металів як золото і срібло, а також залізо та цинк.

Аналіз та порівняння фізико-хімічних властивостей білків mamA, mamB, mamM та mamK магнітосомного геномного кластера магнітотаксисних бактерій та його гомологу білків магнітосомного геномного кластера у протеомі грибів *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* NRRL3357, а також *Trichoderma hamatum* показав наступні результати.

Порівняно з гомологами білків МТБ, спостерігається збільшення молекулярної маси білків досліджуваного мікрогриба *Aspergillus flavus*, в деяких випадках (mamA) в чотирикратному разі. Показники ароматичності є меншими за показники МТБ, але різниця значень є дуже незначною. Ізоклектрична точка досліджених білків співпадає або має невелике відхилення від значень МО МТБ. Індекс нестабільності характеризується незначними відхиленнями від значень МТБ. Ізоелектрична точка та індекс нестабільності досліджуваного білку mamM є однаковими. Далі було обчислено вторинну структуру, де можна прослідкувати схожі значення helix, turn та sheet магнетотаксисного білку mamM. Для інших білків характерна невелика відмінність. Кількість амінокислотних залишків значно відрізняється, адже молекулярна маса є різною. У свою чергу співвідношення

амінокислотних залишків суттєво відрізняється для C, P, Q, S, V. Відповідно, показники гнучкості варіюють, але різниця не є суттєвою.

Для дослідженого представника роду *Fusarium* також спостерігається збільшення молекулярної маси проаналізованих білків. Для білку matK характерні такі ж показники ізоелектричної точки як і у магнітотаксисної бактерії, а також дуже незначні відхилення показників нестабільності та ароматичності. Інші три білки характеризуються відмінними від МТБ показниками за згаданими трьома параметрами. Проте, у всіх білків спостерігаються збіги у вторинній структурі sheet та turn. Незначна розбіжність спостерігається і у показниках кількості амінокислотних залишків та їх співвідношення порівняно з білками мікроорганізмів МТБ. Не дивлячись на це, показники гнучкості мають відхилення, проте незначні.

Проаналізований представник роду *Trichoderma* при вирівнюванні показав незадовільні результати, що підтверджується також при обчисленні фізико-хімічних властивостей. Із співпадінь характерним є збіг ізоелектричної точки з усіма білками магнітотаксисних бактерій, але на цьому схожість характеристик завершується. Усі проаналізовані білки мають розбіжність у молекулярних масах, в рази вищий показник індексу не стабільності, вище значення ароматичності та не схожість вторинних структур. Відповідно, показники вмісту амінокислотних залишків та їх співвідношення теж не співпадають. Графіки гнучкості мають великі відхилення, що свідчить про низьку здатність або неможливість до синтезу наночастинок металів цими мікрогрибами внаслідок еволюційної розбіжності з протеомами магнетотаксисних бактерій.

4. Стартап проєкт

4.1 Резюме: бізнес-ідея, мета стартапу, техніко- економічні показники

Дослідження потенційних продуцентів біогенних магнітних наночастинок серед представників мікрогрибів є актуальним для промислового застосування. Глобальне потепління та зміна клімату спонукали світову громадськість до обізнаності та до зусиль щодо зменшення утворення небезпечних відходів. Таким чином, «зелена» хімія та хімічні процеси поступово інтегруються в науку та промисловість для сталого розвитку [1]. Був проведений аналіз літературних даних на предмет застосування представників мікрогрибів, що є потенційними продуцентами БМН, у зеленому синтезі наночастинок і з'ясовано, що з усіх інших металів наночастинок міді (CuNP) мають багато застосувань у медичній діагностиці, різних цілях, косметиці та багато іншого [57]. Золото, срібло та мідь здебільшого використовувалися для синтезу стабільних дисперсій наночастинок, які корисні в галузі фотографії, каталізу, біологічного маркування, фотоніки, оптоелектроніки та виявлення методом комбінаційного розсіювання з поверхневим розсіюванням [58].

Наночастинок міді також відомі своєю антимікробною активністю та протизапальними засобами, які допомагають загоєнню ран. Гриби при контакті з металами призводять до вироблення метаболітів та інших ферментів, які допомагають захистити себе від небажаних сторонніх речовин. Під час цього процесу метал відновлюється до наночастинок. Коли клітини грибів прикріплюються до іонів металів, вони піддаються реакції відновлення, яка призводить до наночастинок металу з окисненням органічних молекул, таких як білки, ферменти, пептиди тощо. Біонакопичення металів – порівняно економічний метод синтезу без зусиль. Оскільки гриби мають здатність

переносити та біоакумулювати метали, це також є економічним ресурсом [59].

A.flavus – найпоширеніший у ґрунті нитчастий гриб із широким спектром гідролітичних та окислювальних ферментів. Набір таких ферментів є одним із найважливіших у біотехнологічній галузі. *A.flavus* відіграє важливу роль у поглинанні іонів металу з водного розчину [61]. Розробка таких екологічно чистих наночастинок із цієї нанотехнології викликає інтерес у всьому світі та розвиває галузь, яка має багаторазове застосування.

Щоб здешевити синтез наночастинок металів за допомогою грибів, було створено ідею для стартапу «Нано-мідь» з виробництва цих наночастинок грибами *A.flavus* та подальшим поширенням серед підприємств, що їх використовують. Основна ідея стартапу також полягає у низькій цінній категорії та екологічності, щоб такі наночастинок могли собі дозволити як великі підприємства, так і стартап проекти, які мають обмежений бюджет.

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Для врахування факторів ризику було проаналізовано зовнішнє та внутрішнє середовище діяльності підприємства.

Хоча безпосереднього впливу зовнішнє середовище на діяльність підприємства не здійснює, нехтувати цими факторами є ризикованим. Отже, до факторів зовнішнього впливу на діяльність підприємстві відносяться політичні, економічні, демографічні, географічні, культурні фактори, а також науково-технічних прогрес [60].

Таблиця 4.1 – Аналіз загроз і можливостей зовнішнього середовища

Зовнішнє середовище		
Фактор середовища	Загрози	Можливості
Економіка		
Податки	Штраф при неправильному оформленні або невчасній подачі декларацій	Знижена податкова ставка до 2% у період воєнного стану, відповідно зменшення розходів
Курс валют	Підвищення курсу при валютному кредиті на обладнання	Збільшення доходу при укладанні контрактів на збут у іноземній валюті
Політика		
Місцеве законодавство	Зміна регуляцій, що може вплинути на встановлені робочі процеси	Законодавство спрямоване на урегулювання стандартів за європейськими нормами, де відповідність цим нормам дає можливість виходу на іноземний ринок
Науково-технічний прогрес		
Розвиток і поширення нових технологій	Конкуренція на ринку через нові можливо дешевші чи досконаліші процеси	Співпраця з конкурентами, перетворення її на інструмент розвитку

До зовнішнього оперативного середовища відносять ризики пов'язані з конкурентами, постачальниками та споживачами (табл. 4.2) [60].

Таблиця 4.2 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Зовнішнє оперативне середовище		
Фактор середовища	Недоліки	Переваги
Конкуренти	Конкуренція на ринку через нові можливо дешевші чи досконаліші процеси	Співпраця з конкурентами, перетворення її на інструмент розвитку
Постачальники	Проведення додаткових досліджень для заміни речовин, які не зможуть постачатись	Можливість заохочення постачальників зі споріднених сфер для покращення технології
Споживачі	Можлива втрата сподивачів у разі застарілості чи не релевантності технології	Збільшення доходу та впізнаваності підприємства завдяки успішним співпрацям

Виходячи з аналізу вище згаданих факторів загроз зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ можна провести аналіз зацікавлених сторін (табл. 4.3) щоб врахувати ризики, що ці фактори здійснюють підприємству [60].

Таблиця 4.3 Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив її на реалізацію проекту	Цікавість її до проекту	Загальний коефіцієнт впливу на проект
Суб'єкти внутрішнього середовища			
Виробник:			
Кваліфікований науковий співробітник	5	4	9
Контролер якості	5	4	9

Постачальник			
Постачальник хімічних реєтивів	5	4	9
Постачальник спор грибів	5	4	9
Споживачі			
Підприємства з медичної діагностики	4	4	8
Підприємства з виробництва ферментів	4	4	8
Підприємства з виробництва фотоматеріалів	4	4	8
Підприємства з виробництва оптоелектроніки	4	4	8
Посередники			
Банк еквайєр/платіжна система	4	5	9
Сервіс доставки	5	4	9
Суб'єкти зовнішнього середовища			
Політичні структури			
МОЗ України	5	1	3
Податкова	5	1	3
Законодавчі органи центральної влади	5	3	4
Суб'єкти економічного середовища			
Банк, що оформлює ФОП та розрахунковий рахунок	5	4	4,5
Фінансове забезпечення споживачів	4	3	3,5
Фінансово-кредитна система	4	3	3,5
Власники географічних об'єктів			
Лабораторне приміщення	5	4	4,5
Суб'єкти демографії			
Структура населення	5	3	4
Щільність населення	5	3	4
Народжуваність/смертність населення	4	2	3
Суб'єкти культурного середовища			
Споживча культура	4	4	4
Стійкість звичаїв	4	3	3,5
Культурні показники населення	4	3	3,5
Обізнаність населення про зменшення відходів та зелений синтез	4	4	4
Суб'єкти НТП			
Розвиток науково-технічного прогресу в галузі	4	4	4

Ступінь впровадження новітніх технологій та їх розвиток	5	4	4,5
Показники економічної та технічної безпеки існуючих та перспективних технологій	5	4	4,5

Аналіз таблиці показує, що найбільший вплив на підприємство мають суб'єкти внутрішнього середовища, такі як постачальник, адже без сировини виробничий процес є неможливим. Також вплив мають споживачі, без яких не відбудеться збут продукту, але сфер застосування велика кількість, тому знайти їм заміну буде можливо. Такі посередники як еквайер та сервіс доставки не мають критичного впливу на реалізацію проєкту, адже їм можна знайти заміну або альтернативу.

Суб'єкти зовнішнього середовища також мають вплив на проєкт, адже при невідповідності стандартам МОЗ, невідповідності податкових декларацій та обмеженнями зі сторони законодавчих органів центральної влади, проєкт не зможе існувати. Фінансова сторона, що залежить від суб'єктів економічного середовища також піддається його впливу і може вплинути на проєкт, але при залученні власних інвестицій або пошуку інвесторів, банк має не критичний вплив. Географічні та демографічні аспекти впливають на кількість споживачів і відповідно величину попиту, що прямо пропорційно впливає на успіх реалізації проєкту. Суб'єкти культурного середовища та науково-технічного прогресу хоч і мають вплив, але при правильному їх використанні можуть позитивно вплинути на поширення ідеї стартапу.

4.3 Визначення ключових факторів успіху проєкту

Наступним етапом аналізу є визначення факторів успіху виходячи з попередньо визначених ризиків та їх критичності у проєкті. До цих факторів відносяться ті, на які підприємство може саме вплинути [60]. Перш за все це

ціна, географічна доступність та екологічність виробництва та упаковки. Аналіз наведений нижче (табл. 4.4). Конкурент А – HW NANO, підприємство, що є ресейлером китайських товарів, конкурент В – Xinglu Chemical, які теж продають продукцію китайського виробника.

Таблиця 4.4 Оцінка характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Наша продукція	Конкурент А	Конкурент В
Ціна	0,4	4	5	4
Географічна доступність	0,2	4	3	3
Екологічність упаковки	0,1	3	2	4

На основі коефіцієнту вагомості характеристик проведено визначення бальної оцінки кожної характеристики для нашої продукції і для конкурентів (табл. 4.5) і отримані дані представлені на рис. 4.1.

Таблиця 4.5 – Бальна оцінка кожної характеристики продукції

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Наша продукція	Конкурент А	Конкурент В
Ціна	0.4	1.6	2	1.6
Географічна доступність	0.2	0.8	0.6	0.6
Екологічність упаковки	0.1	0.3	0.2	0.4

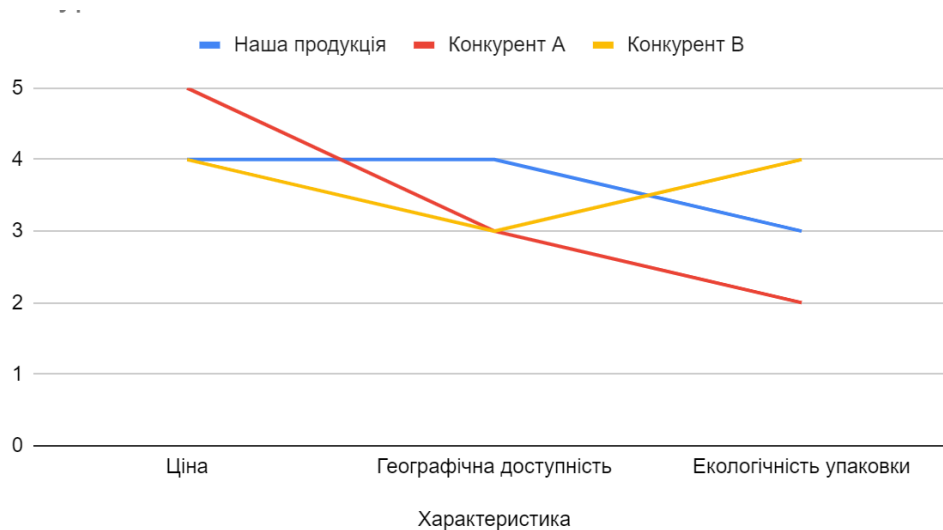


Рисунок 4.1 Порівняння конкурентних переваг нашого підприємства з конкурентами

Аналіз характеристик за методом Шонфільда показав, що ключовим фактором успіху проєкту в порівнянні з конкурентами є географічна доступність.

На основі аналізу ключових факторів успіху стартап-проєкту було сформовано можливі варіанти розвитку інноваційної ідеї та визначено перспективний напрям її розвитку (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1. Зниження витрат на упаковку	За рахунок зниження витрат на упаковку рефінансування отриманих коштів у рекламу.
2. Переміщення офісу у промисловий район	За рахунок переміщення офісу в район, звідки здійснюють найбільше замовлень зниження собівартості доставки.
3. Незмінна ціна	Показати клієнту найдієвість і відсутність потреби штучно знижувати ціну, що показує неухильність принципів і забезпечить стабільну роботу.

4.4 Визначення потенційних споживачів

Для створення проекту необхідно здійснити аналіз потенційного споживача, окреслити його головні потреби, щоб розуміти, на який спектр підприємств можна розраховувати в майбутньому (табл. 4.7) [60]. Для цього необхідно врахувати специфіку виготовленого продукту, а також модель інноваційного продукту - B2B - Business to business (бізнес-бізнесу).

Табл. 4.7 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
<ul style="list-style-type: none"> КВЕД, до якого може належати дане виробництво 	Дослідження і експериментальні розробки у сфері природничих і технічних наук
<ul style="list-style-type: none"> Очікувана потужність стартапу (ма ле підприємство, середнє, велике) 	мале підприємство
<ul style="list-style-type: none"> За масштабом виробництва 	одиничне
<ul style="list-style-type: none"> За рівнем спеціалізації 	вузькопрофільне
<ul style="list-style-type: none"> За ресурсами, що споживатимуться 	матеріаломістке
<ul style="list-style-type: none"> За чисельністю персоналу 	мале
<ul style="list-style-type: none"> За сферою діяльності 	виробниче
<ul style="list-style-type: none"> Бажана сфера пошуку капіталу і контролю для реалізації стартапу (національний, іноземний, спільний багатонаціональний,...) 	національний
<ul style="list-style-type: none"> Бажане географічне розташування <ul style="list-style-type: none"> - потужностей стартапу, - офісу стартапу, - збутової мережі - постачальників комплектуючих 	<ul style="list-style-type: none"> - потужності - Україна, Київ - офісу стартапу – на базі НТУУ «КПІ» - збутової мережі – малі та великі промислові підприємства - постачальників комплектуючих - Україна
<ul style="list-style-type: none"> Органи управління при реалізації стартапу (національні, міжнародні, офшорні, транснаціональні,...) 	національні
<ul style="list-style-type: none"> За характером господарської діяльності 	промисловий

<ul style="list-style-type: none"> За рівнем технологічної цілісності (цілісний комплекс, дочірне утворення, філія,...) 	цілісний комплекс
<ul style="list-style-type: none"> За долею іноземного капіталу (з іноземними інвестиціями (більше 10%), іноземне підприємство (100%). 	без іноземних інвестицій
<ul style="list-style-type: none"> За формуванням статутного капіталу (унітарне, корпоративне) 	унітарне
<ul style="list-style-type: none"> За організацією виробничих процесів (періодичне, безперервне) 	періодичне
<ul style="list-style-type: none"> За роботою протягом року (сезонне, позасезонне) 	позасезонне
<ul style="list-style-type: none"> За географічним розташуванням на території України 	Київ з поширенням на територіях великих підприємств-партнерів
<ul style="list-style-type: none"> За наявністю вільних ОБЗ (коштів) 	50 000 грн.
<ul style="list-style-type: none"> За плановим терміном реалізації проекту 	Самостійна робота з подальшим удосконаленням ідеї

Продовження таблиці 4.8 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Форма реєстрації	Фізична особа
За масштабом	Мале
За сплатоспроможністю	31000 – 50000
Географія	Регіон - Київ Чисельність населення - 400 000 Динаміка росту регіону - прощресивно зростаючий Структура регіону - центральний економічний регіон Правові обмеження торгівлі - КЗПП, Державні санітарні норми і правила.
Обмеження	Соціальний рівень споживачів - не працюють, підробляють тимчасово. Спосіб життя - активний Тип особистості споживачів - студенти
Ставлення до товару	Мотивація придбання – покупка дешевого та екологічного товару Пошук вигоди - найнижча ціна Ставлення до товару - порівняння ціни та якості, користь для виробництва Інформованість про товар - інформування через соц мережі Інтенсивність споживання товару – в залежності від виробничого процесу

Характеристика споживача	Вік – 25-65 Склад сім'ї - без сім'ї/ у шлюбі Рівень доходу – сталий середньостатистичний дохід Етап життєвого циклу сім'ї – не впливає традиції - не впливають
За інтенсивністю споживання товару	Систематичне придбання

Обрана ідея потребує проведення ринкового експерименту, адже опитування споживачів навряд чи допоможе визначити потребу підприємств у розробці. Так як списку підприємств у вільному доступі немає, можна допустити, що об'єм товару, який вони споживають, наявний у літературних даних.

4.5 Розрахунок ціни інноваційної пропозиції на ринку

Визначення потенційного споживача і його особливостей при прийнятті рішення про придбання стартап-продукту дозволяє визначити ціну пропозиції для ідеї, технології, методики, програми на ринку (табл.4.9, 4.10) [60].

Таблиця 4.8 – Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу, місяць		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од.	Ціна, грн/од.	Кількість, од.	Ціна, грн/од.
Наночастинки наномідного порошку	500	1000	50	1050
Грибний фільтрат	300	120	20	200

Таблиця 4.9 – Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Виготовлення наномідного порошку	Хімічний посуд (колби, чашки Петрі, піпетки)	10 тис. грн	2 роки	“ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ВАГИ - ЛАБЗОНА”	Фінансові інвестиції/кредит у банку
Перевірка якості порошку	Спектрофотометр	36 тис. грн	10 років	“Geneo”	
Зберігання товарів до реалізації	Холодильник	25 тис. грн	7 років	“Zanussi”	

Амортизація = $10/2+36/10+25/7 = 12,17$ тис. грн/рік

Вартість обладнання = $10+36+25=71$ тис. грн.

Таблиця 4.10 – Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік,	Ціна, грн /од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина і матеріали	Вихідні хімічні реагенти	1 000	175	ТОВ “Хіміндустрія”	Для першої партії – фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
	Упаковка	13 450	5	ТОВ “ХабСкайлай”	Для першої партії – фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
Паливо, електроенергія	Електроенергія	2400 кВт	6,14	ТОВ “Київські енергетичні послуги”	Для першої партії – фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
	Водопостачання та водовідведення	240 м ³	30,384 грн. за 1 м ³	ПрАТ АК Київводоканал	Для першої партії – фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
Напівфабрикати, запасні частини	Запасні частини	10	50	ТОВ “Хіміндустрія”	Для першої партії – фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства

ОбФ=175000+ 67250+ 14736+7292,16+500= 107 278,16 :12 міс= 8939,85 грн/міс

Таблиця 4.11 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати	Джерело фінансування ФОП
Робочі основні	Кваліфікований науковий співробітник	2	Вища освіта за спеціальністю хімік/біотехнолог	20 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
	Контролер якості	2	Вища освіта за спеціальністю хімік/біотехнолог	15 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
Робочі допоміжні	Прибиральниця	1	Базові навички для прибирання спеціалізованих приміщень	8000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
Спеціалісти	Бухгалтер -HR	1	Вища освіта у сфері фінансів	12 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
	Програміст	1	Вища освіта та практичний досвід розробки сайтів та додатків	15 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
Керівники	Начальник класу	1	Вища освіта у сфері біології	8 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства
	Менеджер з закупівлі	1	Вища освіта та практичний досвід у ресторанному бізнесі	12 000	фінансові інвестиції, потім – з фонду підприємства

Загальна сума заробітної плати становить 125 000 грн, до якої також треба додати податки у розмірі 19,5%, що складає в сумі 149 375. Виплата ЄСВ складає 22% $(ЗП+П*0,22) = 13\,362,5$.

Витрати на заробітну плату щомісячно складають 176 100,5 грн.

Таблиця 4.12 – Калькуляція собівартості стартап-продукту

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
1	Етап розробки ідеї		
	-сировина, матеріали	100	17 500
	-амортизація	1	1 014
	-заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	4	60 945,5
	-електроенергія, паливо	1	1 228
2	Реалізація ідеї		
	-сировина, матеріали	100	17 500
	-амортизація	1	1 014
	-заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	5	75 945,5
	-електроенергія, паливо	1	1 228
3	Етап впровадження (дослідного випробування)		
	-сировина, матеріали	100	17 500
	-амортизація	1	1 014
	-заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	7	141 100,5
	-електроенергія, паливо	1	1 228
4	Масова реалізація		
	-сировина, матеріали	1000	175 000
	-амортизація	9	9 126
	-заробітна плата і нарахування (ЄСВ)	9	176 100,5
	-електроенергія, паливо	9	10 152

Таблиця 4.13 - Техніко-економічні показники проєкту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку	Значення
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Од.	В	4100
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times К_{пер}$	9

3. у тому числі - основних - допоміжних - інженерно-технічного персоналу	Осіб		- Основних 4 - Допоміжних 1 - інженерно-технічного персоналу 4
4. Середньорічний виробіток робітника	Од./особу	$\text{ППс.р.} = \frac{V}{\text{Чсп}}$	1025
5. Капіталовкладення у проєкт:			2 220 484,6
- всього	Грн.	$K = \text{ОФ} + \text{ОБК}$	541,58 од
- на одиницю продукції	Грн./од.		
6. Повна собівартість:			2 232 654,6
- всього	Грн.	$C = A + \text{ОБК}$	544,5 од
- на одиницю продукції	Грн./од.		
7. Відносний прибуток	Грн./од.	$\text{П} = \text{Ц} - C$	575,5
8. Рентабельність	%	$\text{P} = \left(\frac{\text{П}}{C} \right) \times 100$	205,7%
9. Період повернення капіталовкладень	Років	$\text{T}_{\text{пов}} = \frac{K}{\text{П}}$	3,2 роки
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн./грн..	$\text{ФВ} = \frac{(\text{Ц} \times V)}{\text{ОФ}}$	2,068
11. Фондоємкість	Грн./грн..	$\text{ФЄ} = 1/\text{ФВ}$	0,48
12. Продуктивність праці	Грн./особу	$\text{ПП} = \frac{V}{(\text{Чсп} \times T)}$	3796,29
13. Коефіцієнт економічної ефективності		$E = \text{П}/K$	7,91

Після оцінки ринкової ціни товару і визначення рівня його прибутковості можна визначити межу собівартості стартап-продукту. До основних методів ціноутворення відносять [60]:

1. Метод, орієнтований на витрати

$\text{Ц} = C + \text{фіксований відсоток прибутку (від собівартості) [грн/од]}$ (або середня норма прибутку по даному виду товару),

$$\text{Ц} = 66,7 + 5\% = 70,035$$

де Ц – прогнозована ціна товару, грн/од,

C – розрахована автором ідеї, технології, методики очікувана собівартість товару, грн/од.

2. Агрегатний метод:

$$C = C_1 + C_2 + \dots + C_i = 65 + 32 + 55 + 120 + 67 + 161 + 54 = 554 \text{ [грн/од]},$$

де C – ціна ідеї, технології, розробки, за якою автор пропонуватиме її на ринку, грн/од.,

C_i – ціна i -того компоненту багатоконпонентного товару, грн/од.

3. Розрахунок ціни параметричним методом

Враховує вагомість якісних параметрів товару і оцінку цих параметрів споживачем (табл. 4.14)

Таблиця 4.14 – Розрахунок ціни параметричним методом

Продукт	Параметри						Ціна
	1		2		3		
	бали	коефіцієнт вагомості i	бали	коефіцієнт вагомості i	бали	коефіцієнт вагомості i	
Аналог	40	0,2	70	0,4	80	0,4	одного балу = $625 / (40 \times 0,2 + 70 \times 0,4 + 80 \times 0,4) = 9,19$
Новий	50	0,2	80	0,4	70	0,4	$9,19 \times (50 \times 0,2 + 80 \times 0,4 + 70 \times 0,4) = 643,3$

4. Метод на основі аналізу точки беззбитковості

Він полягає в тому, що ціна товару визначається виходячи з розрахунку найбільш оптимального обсягу виробництва, який дозволяє покрити всі витрати підприємства за рахунок отриманого валового доходу, виходячи з «точки беззбитковості» [60].

$$Ц = \frac{2\,232\,654}{12 * 625} = 3505 \text{ од/міс}$$

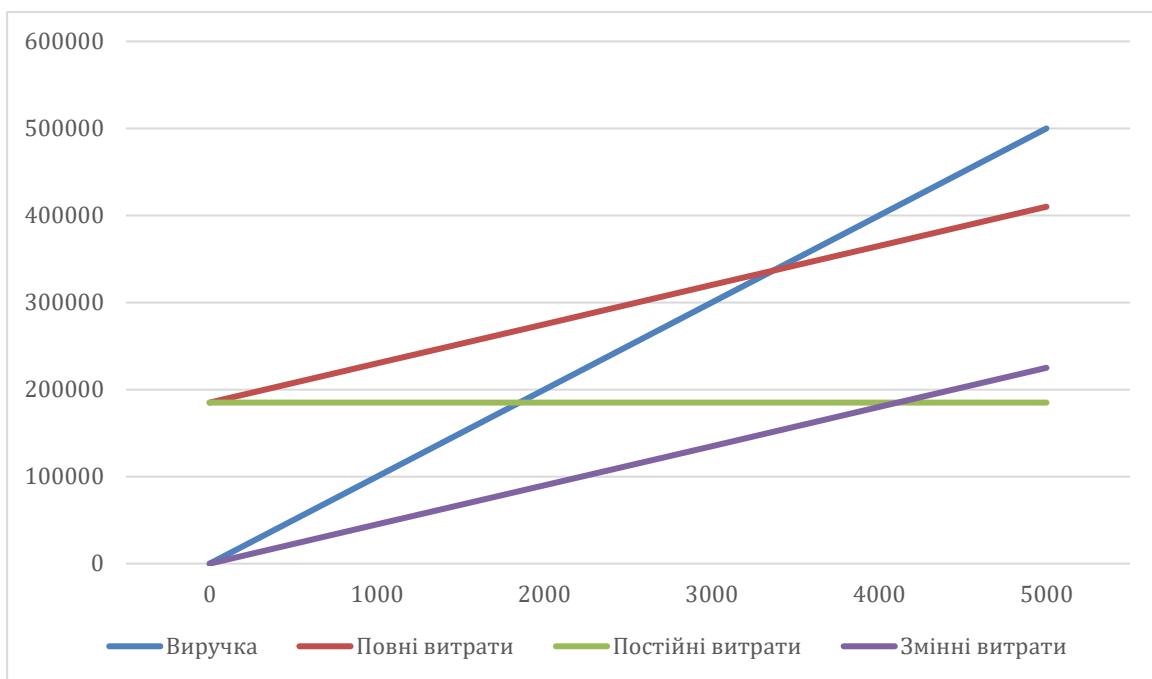


Рисунок 4.2 Визначення точки беззбитковості

4.6 Карта бізнес-процесів реалізації проєкту

Таблиця 4.15 – Карта бізнес-процесів виконання стартап проєкту

Стадія реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Аналіз конкурентів	Власник	1 тиждень	3000
	Пошук інвесторів	Власник	4 тижні	2000
	Пошук постачальників	Менеджер з закупівлі	1 тиждень	5500
	Пошук приміщення для виготовлення продуктів та приміщення для їх збереження	Менеджер з закупівлі	1 тиждень	5500
	Пошук кваліфікованих співробітників	HR	12 днів	7500
	Пошук додаткових працівників	HR	12 днів	7500
Реалізація ідеї	Заключення контрактів з найманими працівниками	HR	15 днів	11000
	Заключення контрактів з лізинговими компаніями	Власник, юрист	3 дні	5000
	Заключення контрактів з орендодавцями	Власник, юрист	3 дні	5000
	Розробка продукту	Кваліфіковані співробітники	4 тижні	40000
	Створення сайту для просування і комунікації з замовниками	Програміст	4 тижні	5000
	Оформлення необхідних документів для відкриття ФОП і легалізації бізнесу	Власник, юрист	2 тижні	11000
	Закупівля сировини	Менеджер з закупівлі	4 дні	17500
Впровадження у виробництво	Запуск сайту	Програміст	5 днів	2000
	Запуск додатку	Програміст	3 дні	2000
	Тестування формату	Власник, програміст	4 тижні	15000
	Запит на фідбек від користувача і відповідне коригування послуг	Власник, програміст	4 тижні	15000
	Розробка яскравої та екологічної упаковки	Власник, креативний менеджер	1 тиждень	10000
Масова реалізація	Реклама	Власник, програміст	10 днів	5000
	Розробка продукції	Кваліфікований співробітник	4 тижні	40000

	Контроль якості продукції	Контролер якості	4 тижні	30000
	Прибирання приміщень	Прибиральниця	2 дні	1000
Закриття або продаж проекту (у разі банкрутства)	Упаковка проекту для продажу	Власник, креативний менеджер	1 тиждень	3000
	Підрахунок вартості проекту	Власник, бухгалтер	3 дні	3000
	Пошук потенційних покупців	Власник, програміст	1 тиждень	2000

Таблиця 4.16 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції Бізнес-процеси	Елементи						
	Власник	Менеджер з закупівлі	Контролер якості	Програміст	Прибиральниця	Кваліфікований співробітник	Бухгалтер-HR
Аналіз конкурентів	1						
Пошук інвесторів	1						
Пошук постачальників		1					
Пошук приміщення для виготовлення продукції та приміщення для їх збереження							1
Пошук кваліфікованих співробітників							1
Пошук додаткових працівників							1
Заклучення контрактів з найманими працівниками							1
Заклучення контрактів з лізинговими компаніями	1						1
Заклучення контрактів з орендодавцями	1						1
Розробка продукту	1					1	
Створення сайту для просування і комунікації з замовниками				1			
Оформлення необхідних документів для відкриття ФОП і легалізації бізнесу	1						1
Закупівля сировини		1					
Запуск сайту				1			

Запуск додатку				1			
Тестування формату				1			
Запит на фідбек від користувача і відповідне коригування послуг	1			1			
Розробка яскравої та екологічної упаковки	1						
Реклама				1			
Розробка продукції	1			1			
Контроль якості продукції	1		1				
Упаковка проєкту для продажу	1						
Підрахунок вартості проєкту	1						1
Пошук потенційних покупців	1						
Прибирання приміщень					1		

4.7 Ризики стартап-проєкту та методи управління ними

Таблиця 4.17 – Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проєкту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Пошук інвесторів	Незацікавленість інвесторів у проєкті	Відсутність монетизації
	Пошук постачальників	Вибір постачальника з високими цінами	Дороговизна сировини для виробництва
Реалізація ідеї	Заклучення контрактів з найманими працівниками	Переманювання працівників конкурентами за рахунок вищої зп	Відсутність працівників
	Заклучення контрактів з лізинговими компаніями	Заклучення невігідного контракту	Висока вартість авто
Впровадження у виробництво	Запуск сайту	Перегруженість серверів	Неможливе здійснення замовлень
	Розробка яскравої та екологічної упаковки	Недостатньо протестована форма	Дискомфорт співробітників і швидка втомлюваність
Масова реалізація	Реклама	Неправильно налаштований таргет, недостовірне інформування споживача	Обрана невірна аудиторія, що призводить втрати клієнтів
	Виготовлення наномірного порошку	Недотримання стандартів МОЗ та місцевих органів управління	Зняття продукту з продажу, штрафи, компенсації клієнтам, що отруїлись
Закриття або Продаж проєкту (якщо передбачено)	Упаковка проєкту для продажу	Упаковка проєкту не спеціалістами	Недооцінення проєкту і невігідний продаж
	Пошук потенційних покупців	Незацікавленість покупців проєктом	Вихід з проєкту зі збитками

Таблиця 4.18 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Політико-законодавчий ризик	Зміна законодавства і невідповідність цьому налагодженого процесу	Низька ймовірність	Високий рівень
Ринковий ризик	Різкий стрибок курсу валют і збільшення ціни на сировину	Середня ймовірність	Високий рівень
Внутрішні ризики			
Транспортний ризик	Доставка продукту невчасно через корки на дорогах	Висока ймовірність	Низький рівень
Ризик персоналу	Відсутність на зміні необхідної кількості персоналу, внаслідок чого продукція не буде вироблятися	Низька ймовірність	Середній рівень

Таблиця 4.19 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Політико-законодавчий ризик	Передача ризику	Аутсорсинг ризику	1 тиждень	Зміна схеми виробництва відповідно до чинного законодавства
Ринковий ризик	Прийняття ризику	Створення резервів (в у натуральній або грошовій формі (фондів самострахування або фондів ризику))	Час нестабільного коливання курсу валют	Утримання компанії у стабільному стані
Транспортний ризик	Попередження (скорочення) ризику	Стратегічне планування діяльності	1 тиждень	Зміна транспортних засобів на

				компактніші та розширення локацій виробництва ближче до регіону з найбільшою кількістю замовлень
--	--	--	--	--

Отже було досліджено доцільність створення стартап проєкту з вироблення нано-мідного порошку. Було проведено аналіз загроз і можливостей середовищ проєкту, визначення ключових факторів успіху, потенційних споживачів, розрахована ціна інноваційної пропозиції, а також проведений системний аналіз бізнес-процесів стартапу з подальшим визначенням ризиків і створенням плану заходів управління ними.

Найбільший вплив на підприємство мають суб'єкти внутрішнього середовища, такі як постачальник, адже без сировини виробничий процес є неможливим. Також вплив мають споживачі, без яких не відбудеться збут продукту, але сфер застосування велика кількість, тому знайти їм заміну буде можливо. Такі посередники як еквайер та сервіс доставки не мають критичного впливу на реалізацію проєкту, адже їм можна знайти заміну або альтернативу.

Суб'єкти зовнішнього середовища також мають вплив на проєкт, адже при невідповідності стандартам МОЗ, невідповідності податкових декларацій та обмеженнями зі сторони законодавчих органів центральної влади, проєкт не зможе існувати. Фінансова сторона, що залежить від суб'єктів економічного середовища також піддається його впливу і може вплинути на проєкт, але при залученні власних інвестицій або пошуку інвесторів, банк має не критичний вплив.

Серед ключових факторів успіху було визначено здатність до регулювання ціни, здешевлення товару у порівнянні з конкурентами, адже товар виготовляється на території України і доставка до локальних

підприємств дешевша і екологічніша, ніж з Китаю.

Аналіз ключових споживачів показав, що поодинокі споживачі не є ключовою аудиторією, на відміну від великих підприємств чи невеликих стартап проєктів, що займаються медичним обладнанням, фотознімком чи виробництвом ферментів.

При розрахунку ціни було визначено, що чистий прибуток складає доволі високий відсоток за рахунок дешевизни вихідної сировини і унікальності продукту, що дає можливість поставити високу ціну на кінцевий товар та вкласти прибуток у подальший розвиток технологій. Проєкт дуже рентабельний, адже не потребує великих затрат на обладнання. При пошуку постачальників та заключенні вигідних контрактів оптового постачання, прибутковість такого проєкту гарантована.

Було підраховано кількість персоналу для успішного здійснення усіх етапів бізнес-процесів і визначено, що 9 співробітників достатньо для забезпечення виробництва продукції, її доставки, розробки додатку та сайту для поширення та застосування маркетингових стратегій. Так як компанія турбується про хорошу якість та екологічність, пріоритети після успішного впровадження проєкту, будуть зміщені на досягнення максимальної екологічності, що так важлива у сучасному світі і співпадає з мисленням клієнтів, що обирають осмислений спосіб життя.

Як у будь-якому процесі, на шляху проєкту можуть стояти певні ризики, як зовнішні так і внутрішні. Для передбачуваних та непередбачуваних ризиків було визначено ступінь впливу на успіх проєкту та методи боротьби з ними. Для уникнення можливих ризиків був розроблений план із залученням аутсорсингових співробітників щоб утримати компанію у стабільному стані.

5. Охорона праці та навколишнього середовища

Обов'язки роботодавця

Організація охорони праці на підприємстві покладається на роботодавця. Завдання роботодавця також полягає у забезпеченні дотримання прав робітників, передбачених у нормативних та регуляторних актах з охорони праці.

Для створення безпечних і здорових умов праці роботодавець виконує, зокрема, такі функції [62]:

- формує відповідні відділи і призначає уповноважених осіб для нагляду за дотриманням вимог охорони праці, затверджує внутрішні правила, технологічні карти та стандарти;
- затверджує колективний договір та вживає комплексні заходи для підтримання і підвищення рівня охорони праці;
- розробляє програму оптимізації виробництва, впроваджує новітні технології та наукові досягнення;
- відповідає за належний стан промислових будівель, приміщень, виробничого обладнання та машин;
- вживає невідкладних заходів для допомоги постраждалим, організовує виплату компенсації таким особам;
- ініціює проведення неупередженого та об'єктивного розслідування нещасних випадків, вивчає причини, що призвели до аварії та затверджує перелік профілактичних заходів, спрямованих на усунення ризиків виникнення аналогічних причин в подальшому;
- несе персональну відповідальність за рівень охорони праці і порушення іншими особами її вимог;
- здійснює нагляд за дотриманням робітниками технологічних процесів, установлених правил поведінки та режиму роботи.

Обов'язки працівників

Статтею 14 ЗУ «Про охорону праці» передбачено такі обов'язки працівника щодо додержання вимог нормативно-правових актів з охорони праці [62]:

- дбати про власну безпеку, а також про безпеку сторонніх людей при виконанні робіт чи під час перебування на території підприємства;
- користуватися засобами колективного та засобами індивідуального захисту;
- знати і виконувати вимоги нормативно-правових актів з охорони праці, правила поведіння з машинами, механізмами, устаткуванням та іншими засобами виробництва;
- проходити періодичні медичні огляди, навчальні курси, інструктажі, атестацію знань з безпеки праці.

Також працівники під час прийняття на роботу і в процесі роботи повинні проходити за рахунок роботодавця інструктаж, навчання з питань охорони праці, з надання домедичної допомоги потерпілим від нещасних випадків і правил поведінки у разі виникнення аварії.

Працівник несе безпосередню відповідальність за порушення зазначених вимог [62].

Висновки

Отже, у ході виконання роботи було виконано поставлені задачі, а саме було досліджено представників мікрогрибів на здатність виробляти біогенні магнітні наночастинки як у літературних даних, так і практичним дослідженням методами порівняльної геноміки, а також був здійснений аналіз на основі пошуку білків-гомолгів, що приймають участь у біомінералізації мікрогрибів з білками мінералізації у магнітотаксисних бактерій.

Літературний огляд показав актуальність використання наночастинок у різноманітних галузях, таких як медичне зображення, нанокompозити, фільтри, доставка ліків, гіпертермія пухлин та нові антимікробні засоби. Окрім медицини, наночастинки набули практичного застосування у виробництві, сільському господарстві, екології, енергетиці, електроніці та медицині. Вони використовуються як промислові покриття, мастила, каталізатори, газові датчики, магнітні сепаратори, антиоксиданти, електроди паливних елементів, тощо.

На основі здійсненого біоінформатичного аналізу, а саме локального вирівнювання мікрогрибів родів *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, та *Penicillium* показано, що всі досліджені мікрогриби, окрім представників роду *Cladosporium*, є потенційними продуцентами зовнішньоклітинних кристалічних біогенних магнітних наночастинок. Усі організми, що мають задовільні результати біоінформатичного аналізу відносяться до групи зовнішньо-клітинні кристалічні БМН.

Розрахунок фізико-хімічних властивостей білків біомінералізації біогенних магнітних наночастинок у мікрогрибів показав, що більшість гомолгів *matA* у мікроміцетів, що показали найкращі вирівнювання з білками МТБ, є основними стабільними ароматичними білками, так само як і білки біомінералізації БМН *matB* та *matM*. Показники *matK*

відрізняються лише ізоелектричною точкою, що свідчить про кислотність білку.

На основі аналізу таких властивостей як молекулярна маса, ароматичність, ізоелектрична точка, індекс нестабільності, вторинна структура, кількість і вміст амінокислотних залишків, а також гнучкість виявлено, що ці показники грибів *Fusarium oxysporum* та *Aspergillus flavus* NRRL3357 мали незначні відмінності в порівнянні з білками МТБ, а саме більшу молекулярну масу і відповідно інший показник вмісту АКЗ. Той результат, що значення ізоелектричної точки, ароматичності та індексу нестабільності відрізнялись не суттєво або співпадали з відповідними значеннями для білків МТБ свідчить про спільне походження з МО МТБ і відповідну здатність до синтезу наночастинок відповідних металів.

Результати обчислень для білків *Trichoderma hamatum* співпали з відповідними значеннями для білків МТБ лише для ізоелектричної точки, проте всі інші показники значно відрізняються, що свідчить про низьку здатність або неможливість до синтезу наночастинок металів цими мікрогрибами внаслідок еволюційної розбіжності з протеомами магнетотаксисних бактерій.

Було розроблено стартап проєкт з вироблення нано-мідного порошку, що виявився дуже рентабельним і перспективним для подальшого розвитку, адже є єдиним продуктом на локальному ринку з виробництвом безпосередньо в Україні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. P. T. Anastas and J. Warner, Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York, NY, USA, 1998.
2. Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom. An Introduction to Bionanotechnology. — London: Imperial College Press, 2007. — 183 p.
3. Functionalization, and Application, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 1222 – 124, DOI:10.1002/anie.200602866
4. Xia Hong, Wei Guo, Hang Yuan, Jun Li, Yanmei Liu, Lan Ma, Yubai Bai, Tiejin Li, Periodateoxidation of nanoscaled magnetic dextran composite, J.Magn. Magn. Matr. 2004, 269, 95-100
5. Nochehdehi, Amirsadegh Rezazadeh, et al. "Fe, Co based bio-magnetic nanoparticles (BMNs); synthesis, characterization and biomedical application." Recent trends in nanomedicine and tissue engineering 16 (2017): 157-196.
6. Dinali R, Ebrahiminezhad A, Manley-Harris M, Ghasemi Y, Berenjian A. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology. Crit Rev Microbiol. 2017 Aug;43(4):493-507. doi: 10.1080/1040841X.2016.1267708. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28068855.
7. OV Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, Journal of Nanobiotechnology 2004;2:3 DOI: 10.1186/1477-3155-2-3.
8. Mehta, R. V. (2017). *Synthesis of magnetic nanoparticles and their dispersions with special reference to applications in biomedicine and biotechnology. Materials Science and Engineering: C, 79, 901–916.* doi:10.1016/j.msec.2017.05.135
9. Muhammad Rafique, Iqra Sadaf, M. Shahid Rafique & M. Bilal Tahir (2017) A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 45:7, 1272-1291, DOI: 10.1080/21691401.2016.1241792
10. Banerjee, Kangkana, and Ravishankar R. Vittal. "Aspergillus

fischeri mediated biosynthesis of gold nanoparticles and their beneficially comparative effect on normal and cancer cell lines." *Pharmaceutical Nanotechnology* 5.3 (2017): 220-229.

11. Vijayanandan, Ajuy Sundar, and Raj Mohan Balakrishnan. "Biosynthesis of cobalt oxide nanoparticles using endophytic fungus *Aspergillus nidulans*." *Journal of environmental management* 218 (2018): 442-450.

12. Jin FJ, Hu S, Wang BT, Jin L. *Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus Aspergillus oryzae*. *Front Microbiol.* 2021 Feb 23;12:644404. doi: 10.3389/fmicb.2021.644404. PMID: 33708187; PMCID: PMC7940364.

13. Bhainsa, Kuber C., and S. F. D'souza. "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*." *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 47.2 (2006): 160-164.

14. Электронный ресурс, посилання (10.10.2022) – https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aspergillus_oryzae.jpg

15. Kubicek, C. P. and Harman, G. E. 1998. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor & Francis, London. 278 pg.

16. Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., and Puckhaber, L. S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90:248-252.

17. Raja, M., et al. "Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma harzianum* Th3 and its efficacy against root rot complex pathogen in groundnut." *Materials Today: Proceedings* 43 (2021): 3140-3143.

18. Tomah, Ali Athafah, et al. "Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using Screened *Trichoderma* Isolates and Their Antifungal Activity against *Sclerotinia sclerotiorum*." *Nanomaterials* 10.10 (2020): 1955.

19. Saravanakumar, Kandasamy, and Myeong-Hyeon Wang. "Trichoderma based synthesis of anti-pathogenic silver nanoparticles and their characterization, antioxidant and cytotoxicity properties." *Microbial Pathogenesis* 114 (2018): 269-273.
20. Chi, Zhi-Lai, et al. "Fungal–mineral interactions modulating intrinsic peroxidase-like activity of iron nanoparticles: Implications for the biogeochemical cycles of nutrient elements and attenuation of contaminants." *Environmental Science & Technology* 56.1 (2021): 672-680.
21. Oktarina, Hartati. The effect of silver nanoparticles on *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* spp., and fungal soil communities. Diss. Newcastle University, 2017.
22. Электронный ресурс, посилання (10.10.2022) – https://uk.wikipedia.org/wiki/Trichoderma#/media/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:Trichoderma_harzianum.jpg
23. Mrázek, J; Pachlová, V; Buňka, F; Černíková, M; Dráb, V; Bejblová, M; Staněk, K; Buňková, L (11 September 2015). "Effects of different strains *Penicillium nalgiovense* in the Nalžovy cheese during ripening". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96 (7): 2547–54. doi:10.1002/jsfa.7375
24. Leitão, A.L. (2009). "Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field". *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6 (4): 1393–417. doi:10.3390/ijerph604139
25. Soliman, Amal M., et al. "Green approach to overcome the resistance pattern of *Candida* spp. using biosynthesized silver nanoparticles fabricated by *Penicillium chrysogenum* F9." *Biological Trace Element Research* 199.2 (2021): 800-811.
26. Ali, Alyaa, et al. "Antimicrobial potentiality of green synthesized iron oxide nanoparticles by *Penicillium roqueforti*." *Egyptian Journal of Pure and Applied Science* 59.1 (2021): 29-43.

27. Электронный ресурс, посилання (10.10.2022) – <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/penicillium>
28. Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. 2003. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci.* 85:162–170.
29. Duran N, Marcato PD, De Souza GI, Alves OL, Esposito E. 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J Biomed Nanotechnol.* 3:203–208.
30. Bahrulolum, Howra, et al. "Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector." *Journal of Nanobiotechnology* 19.1 (2021): 1-26.
31. Casey, R. M. "BLAST sequences aid in genomics and proteomics." *Business Intelligence Network* (2005).
32. Электронный ресурс, посилання (17.09.2022) – <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
33. Nakazawa, Hidekazu, et al. "Whole genome sequence of *Desulfovibrio magneticus* strain RS-1 revealed common gene clusters in magnetotactic bacteria." *Genome research* 19.10 (2009): 1801-1808.
34. Sabine Rosenfeldt et al. Towards standardized purification of bacterial magnetic nanoparticles for future in vivo applications, *Acta Biomaterialia* (2020). DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.042
35. В.А. Ратнер, Генетический код как система, *Соросовский Образовательный Журнал.* 6 (2000) 17–22.
36. Li, Weizhong, et al. "Saturated BLAST: an automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology." *Bioinformatics* 16.12 (2000): 1105-1110.
37. Timilsena Y.P., Adhikari R., Barrow C.J., Adhikari B. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from

Australian chia seeds. Food Chem. 2016;212:648–656.
doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.017.

38. Электронний ресурс, посилання (16.11.2022) –
<https://biopython.org/wiki/ProtParam>

39. Esteban Lanzarotti, Rolf R. Biekofsky, Darío A. Estrin, Marcelo A. Marti, and Adrián G. Turjanski "Aromatic–Aromatic Interactions in Proteins: Beyond the Dimer" Journal of Chemical Information and Modeling 2011 51 (7), 1623-1633 DOI: 10.1021/ci200062e

40. Rosenberg, Martin; Dahlstrand, Christian; Kilsa, Kristine; Ottosson, Henrik (2014-05-28). "Excited State Aromaticity and Antiaromaticity: Opportunities for Photophysical and Photochemical Rationalizations". Chemical Reviews. 114 (10): 5379–5425. doi:10.1021/cr300471v

41. R. Lobry, C. Gautier, Hydrophobicity, expressivity and aromaticity are the major trends of amino-acid usage in 999 Escherichia coli chromosome-encoded genes, Nucleic Acids Research, Volume 22, Issue 15, 11 August 1994, Pages 3174–3180, <https://doi.org/10.1093/nar/22.15.3174>

42. Guruprasad, K., Reddy, B.V.B. and Pandit, M.W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. Protein Eng. 4,155-161.

43. Teilum K, Olsen JG, Kragelund BB. Functional aspects of protein flexibility. Cell Mol Life Sci. 2009 Jul;66(14):2231-47. doi: 10.1007/s00018-009-0014-6. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19308324.

44. Westermeier, R. (2019). Isoelektrischer Punkt. In: Gressner, A.M., Arndt, T. (eds) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_1635

45. Srinivasan R, Rose GD. A physical basis for protein secondary structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7;96(25):14258-63. doi:

10.1073/pnas.96.25.14258. PMID: 10588693; PMCID: PMC24424.

46. Cubellis MV, Caillez F, Blundell TL, Lovell SC. Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. *Proteins*. 2005 Mar 1;58(4):880-92. doi: 10.1002/prot.20327. PMID: 15657931.

47. Gorobets, Svitlana & Gorobets, Oksana & Kovalchuk, Iryna & Yevzhyk, Liubov. (2018). Determination of Potential Producers of Biogenic Magnetic Nanoparticles Among the Fungi Representatives of Ascomycota and Basidiomycota Divisions. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2. 232-245. 10.20535/ibb.2018.2.4.147310.

48. M. Vainshtein, N. Suzina, E. Kudryashova, E. Ariskina New magnet-sensitive structures in bacterial and archaeal cells . *Biology of the Cell*. 2002. P. 29–35.

49. Banerjee, Kangkana, and Ravishankar R. Vittal. "Aspergillus fischeri mediated biosynthesis of gold nanoparticles and their beneficially comparative effect on normal and cancer cell lines." *Pharmaceutical Nanotechnology* 5.3 (2017): 220-229.

50. Issa, M. A. "Rapid enzymatically reduction of zincum gluconicum for the biomanufacturing of zinc oxide nanoparticles by mycoextracellular filtrate of penicillium digitatum (Pdig-B3) as a soft green technique." *Archives of Razi Institute* 77.1 (2022): 101.

51. El-Kadi, Sherif Mohamed, et al. "Comparison between silver nanoparticles and silver nitrate as antifungal agent." *International Journal of Nanoscience and Nanoengineering* 4.1 (2018): 5-1.

52. Campos, Carolina, et al. "Surface-enhanced Raman spectroscopy and ultrastructural analysis of penicillin-producing *Penicillium rubens* strains." *Journal of Microscopy* 286.1 (2022): 22-30.

53. Bazioli, Jaqueline Moraes, et al. "Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential." *Molecules* 22.6 (2017): 858.
54. Scheufler, C. et al. (2000) *Cell* 101(2), 199–210
55. Kolaj-Robin, Olga; Russell, David; Hayes, Kevin A.; Pembroke, J. Tony; Soulimane, Tewfik (2015). Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function. *FEBS Letters*, 589(12), 1283–1295. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.007
56. John R. Goldblum MD, in *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*, 2020
57. Hassan Saba (2015) *Research Journal of Recent Sciences.*, Vol 4 (ISC 2014)., Review on Nanoparticles: Their synthesis and types (9-11)
58. I. Hussain, M. Brust, A. J. Papworth, and A. I. Cooper, "Preparation of acrylate-stabilized gold and silver hydrosols and gold-polymer composite films," *Langmuir*, vol. 19, no. 11, pp. 4831–4835, 2003.
59. Ingale A.G, Chaudhari A (2013) *Journal of Nanomed., Nanotechnol.* 4(2), DOI: 10.4172/2157-7439.1000165, Biogenic Synthesis of nanoparticles and Potential applications : An eco-friendly Approach.
60. О.А. Підлісна, Ю.В. Тюленєва «ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА МАГІСТЕРСЬКОЇ ДИСЕРТАЦІЇ: РОЗРОБЛЕННЯ СТАРТАП-ПРОЄКТУ» Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 32 с.
61. Schuster E, Dunn-Coleman N, J. Frisvad J, Dijck P.V (2002) *Applied Microbiology Biotechnology*, vol 59(4-5), On the safety of *Aspergillus niger* a review. 426-435.
62. Електронний ресурс, посилання (20.11.2022) <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2694-12#Text>