

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната степен „доктор” в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, докторска програма „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“

Тема и автор на дисертационния труд: Разработване на технология за биопродукти на основата на органични източници, Николай Янков Солаков

Член на научното жури: Проф. д-р Ангел Иванов Ангелов, Университет по хранителни технологии, 5.11. Биотехнология, заповед назначаване на НЖ РД 05-75/22.05.2023 г.

Кратко представяне на докторанта

Николай Янков Солаков е роден на 30.07.1969 год. През 2014 год. придобива ОКС „Бакалавър“ по специалност „Медицинска химия“ в Химически факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, а през 2015 г. придобива ОКС „Магистър“ по специалност „Хранителна химия“ в същия университет. В периода на своето обучение, той проявява и предприемачески умения и участва в разработването, внедряването и контрола на технологични процеси в производството на хранителни продукти, както и в други развойни дейности в хранително-вкусовата промишленост. От 26.01.2017 г. е зачислен в задочна форма на докторантура в Института по криобиология и хранителни технологии, към ССА. В този период докторантът участва в разработването на нови продукти за провеждане на експериментално производство и в провеждането на редица инструментални методи за анализ. За своята научна работа е награден два пъти с Диплома в конкурс за иновации в раздел „Научна дейност и разработки“ на Международното изложение „АГРА“.

Докторантът владее на добро ниво писмено и говоримо английски език. Притежава много добри компютърни умения в ползването на приложни програми на Microsoft Office, работа със специализиран софтуер за статистическа обработка SPSS Statistics и със специализирани бази от данни с научна литература.

Обща характеристика на дисертацията и автореферата – обем и структура

Представената ми за рецензия дисертация е написана на 168 стандартни страници. Нейната структура обхваща разделите: Въведение – 3 стр.,

Литературен обзор – 47 стр., Изводи от литературния обзор – 3 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и Методи – 26 стр., Резултати и обсъждане – 40 стр., Изводи – 3 стр., Основни приноси – 3 стр., Използвана литература – 20 стр. и научни публикации и участия в конференции и проекти.

Трудът е насочен към разработване на технология за получаване на биопродукти на основата на органични източници - висши медицински гъби *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis*, и *Cordyceps militaris*. Поставената цел и планирани задачи напълно отговарят на докторската програма претендирана от докторанта „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“ от професионално направление 5.12. Хранителни Технологии.

В Литературният обзор на дисертацията последователно се разглеждат и анализират научни публикации относно:

- ✓ Приложение на различни видове висши гъби като източници на биологично активни вещества за получаване на функционални биопродукти за медицински и хранителни цели – световен опит.
- ✓ Методи за култивиране на диворастящи висши гъби – видове хранителни субстрати и условия на култивиране.
- ✓ Биотехнологични методи за получаване на биологично активни екстракти от висши гъби.
- ✓ Методи за получаване на стабилни междинни форми (междинна суровина за последващо влагане в краен продукт) на получените екстракти.
- ✓ Сублимационно сушене – механизъм на процеса и фактори, влияещи върху качеството на крайния продукт.

Цитираната литература в своята цялост обхваща 207 литературни източници, публикувани след 2010 година, което несъмнено е доказателство за актуалността на разработваната тематика. Много добро впечатление прави извеждането на Изводи от направения литературен обзор, които дават основание и насоки за много точно и коректно формулиране на целите и задачите, които докторанта си поставя в своя дисертационен труд.

На основата на направения литературен обзор е поставена и целта на дисертационната разработка: разработване на технология за получаване на биопродукти на основата на органични източници. Така формулирана целта е ясна и точна, с насоченост към четири вида медицински гъби и получени от тях продукти, които да се използват за получаване на функционален биопродукт

„FibrinoZIME. Произтичащите от тази цел задачи са добре определени, ясни и насочени към доказване на поставената цел на изследването.

В раздела “Материали и методи” подробно са описани всички използвани стартерни клетъчни култури от висши медицински гъби, компонентите използвани при изготвяне на функционалния продукт, технологични (лабораторни и полупромишлени) и аналитични методи, условията и апаратурата за BETX необходима за анализ на биологично-активните вещества.

Разделът “Резултати и дискусия” е основен за дисертацията. Той обхваща около 40 страници, богато е илюстриран с таблици и фигури. Докторантът с голяма прецизност и аналитичен подход е отразил извършения от него експериментален труд. Началото на раздела е отделено на голям по обем работа свързан с култивиране на клетъчна култура на висши медицински гъби *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* в течна среда. Прави добро впечатление, че докторанта прилага най-съвременните техники за култивиране и определя степента на нарастване на мицела чрез измерване обема на неусвоената хранителна среда. Експериментирани са няколко състава на хранителната среда и на база на получените резултати докторанта мотивирано продължава своята по-нататъчна работа с хранителната среда M2 със съдържание на картофено нишесте, пептон, дрождев екстракт, глюкоза, FOS, $MgSO_4 \times 7 H_2O$, Витамин B₁, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $FeSO_4$ за култивиране на мицел от посочените по-горе висши гъби. Получените резултати от тези експерименти са представени чрез фигури и са обобщени в таблици, което несъмнено спомага за по-лесното им проследяване.

В следващия етап, докторанта доказва, че нарастването на мицела при култивиране на четирите медицински гъби на твърда хранителна среда се наблюдава между 30-ти и 90-ти ден, като най-добър резултат при всички изследвани гъби се отчита при хранителна среда S2, която е с добавен въглероден източник ориз.

Логично, процесите на култивиране завършват с провеждане на полупромишлен метод за култивиране на клетъчна култура от *Cordyceps militaris* за получаване на плодно тяло и високо съдържание на кордицепин. Получени са общо четири вида изходни суровини за екстракти за влагане в крайни дозови форми. При тези условия на култивиране общото количество субстрати в системата в среда IM1 се увеличава с 27,5%, а в среда IM2 - 51%.

Иновативен подход в изследванията на докторанта е освобождаването на биологично активните вещества от клетката и клетъчната стена, без използване на органични разтворители, а с обработка с ензими и микробни

култури за разграждане структурите на клетката, която протича в температурен диапазон 18-20°C. За тази задача, докторантът използва като изходна суровина жив мицел от *Ganoderma lucidum*, който съдържа над 400 вида биологично активна вещества. За разграждането на клетъчната стена са използвани ензимите лаказа, липаза, алфа амилаза, целулаза, хитиназа, а също е проведена и ферментация с *Bacillus subtilis*. Разграждането на клетъчната стена е установено чрез микроскопско наблюдение, а чрез хроматографски анализ е доказано наличие на глюкозамин, което е убедително доказателство за разграждане на хитиновия слой от клетъчната стена на гъбните клетки.

Съществена част в дисертацията е доказването на наличие на биологично активни вещества – производни на кордицепина и аденозина, пептиди с различна молекулна маса, фенолни и антиоксидантни съединения в екстракти от мицел на *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps militaris*. Известно е, че производни на кордицепина и аденозина имат изразени терапевтични свойства свързани с повишаване енергията на клетката, подобряване на клетъчния имунен отговор, предпазване на сърдечно-съдовата дейност и др. Установено е, че концентрацията на производни на кордицепина и аденозина в пробата от *Cordyceps militaris*, култивирана в хранителна среда с оптимизиран състав достига до 2.22% и 0.64%, което е повишение спрямо контролната среда с 1.9% и 0.24%.

Последната част от дисертационния труд е свързана с разработването на нов функционален продукт - „FibrinoZIME”, за който е формулиран рецептурен състав и е създадена технология за неговото производство. Отлично впечатление прави, че докторантът прилага иновативен подход, който е свързан с използването на комбинирано действие на различни ензими с фибринолитично действие, които се различават по молекулната маса (от 10 до 110 kDa) и имат възможността да разграждат фибринов и амилоиден белтък, като по този начин значително намаляват патогенния ефект причинен от натрупване на плаки в тъканите.

Авторефератът на дисертационния труд, който е в обем от 48 стр. напълно отговаря на изискванията на Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в ССА, като обхваща изцяло следните раздели от дисертационния труд Въведение, Изводи от литературния обзор, Цел и задачи, Материали и Методи, Резултати и обсъждане, Основни Изводи, Приноси, Списък с публикации и участията в научни форуми на докторанта по темата на дисертацията.

Актуалност на проблема

Използването на диворастящите висши гъби за поддържане на добро здраве и лечение на болести съществува от древни времена в азиатските региони, докато останалият свят този подход е значително по-нов. През последните години се наблюдава засилен интерес към използване им не само като функционална храна, но и под формата на хранителни добавки, нутрицевтични продукти и микотерапевтични продукти. Висшите гъби са богат източник на биологично-активни вещества, които могат се използват като съставки при производството на функционални продукти от хранителната, фармацевтичната и козметичната индустрии. Известно е, че медицинските гъби имат редица фармакологични действия като антимикробни, противовъзпалителни, имуномодулиращи, антидиабетични, цитотоксични, антиоксидантни, хепатопротективни, противоракови, антиалергични, пребиотични и др. свойства. Към настоящия момент добре изучени са не повече от 10% от познатите гъбни организми, което предоставя огромна възможност за провеждане на научни изследвания в тази област, както и получаване на биологично-активни екстракти за използване в различни области на икономиката и селското стопанство. В този глобален контекст направлението избрано от докторанта и неговите научни ръководители е изключително модерно, актуално и тясно свързано с практиката и нейните нужди от разработване на нови функционални храни на база екстракти от диворастящи гъби.

Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Докторантът показва с настоящата разработка много добро ниво на познаване и владение на изучаваната материя. Въз основа на извършеният солиден литературен обзор по темата на дисертацията, докторантът е представил изчерпателно състоянието на проблемите на прилагането на комбинираните биотехнологични подходи за използването на биологично активни компоненти от естествени органични източници. Показана е важността на търсенето на решения и предприемането на дейности свързани със създаване на нова технология, при която хранителната среда за култивиране на микробния щам-продуцент *Bacillus subtilis* е част от състава на крайния продукт и е източник на протеолитични, фибринолитични, целулазни, глюканазни, хитиназни ензими и други биологично активни компоненти.

Методичен подход

Разделът с материали и методи на проведените изследвания е представен ясно и нагледно и включва описание на стъпките и етапите на разработката. Приемам като обосновано и разумно избран подхода за детайлно представяне на дизайна на проучванията. Използваните изследователски методи, източници на данни и материали са правилно подбрани. Детайлно са описани източниците на информация, като това обосновава представителност и значимост на резултатите и направените изводи. Познаването и боравенето със съвременни аналитични методи потвърждава извода за значимост и валидност на проучванията, както и нагласите за самостоятелна изследователска работа на докторанта. Считаю, че използваният методичен апарат е достатъчно изчерпателен, позволява достигането на поставената цел и реализиране на задачите на изследванията. За постигането на завършеност на дисертационния труд категорично са изпълнени целта и задачите. В резултат на извършените изследвания, приемам че докторантът е усвоил основни научни методи и техники.

Приноси на дисертационния труд

Считаю, че така разработеният и представен за оценка дисертационен труд е значим с постигнатите резултати в изключително актуалната тема за изследване и създаване на нови функционални продукти. Приносите са дефинирани като научни, научно-приложни и приложни. Считаю, че работата по настоящия дисертационен труд е довела до следните по-значими приноси :

- ✓ Експериментално е доказано наличието на биологично активни компоненти (производни на аденозин (кордицепин), пептиди с различна молекулна маса, фенолен профил и антиоксидантна активност) в екстракти от мицел на *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps militaris*.
- ✓ Установени са основните параметри на процеса сублимационно сушене на мицел от *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps militaris*, в качеството им на компоненти от състава на функционален биопродукт „FibrinoZIME”.

- ✓ Експериментално е приложен полупромишлен метод за продуциране на мицел и плодно тяло от висши медицински гъби - *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* върху твърда хранителна среда, като е постигнато увеличение съдържанието в екстракта на *Cordycepin*, *Adenosin* и неговите производни 5,25 пъти спрямо стандартните методи за производство.
- ✓ Установени са параметрите на полупромишлено производство на *Cordyceps militaris* в реални условия във ферма за отглеждане на медицински гъби с предприятие за производство на екстракти, намиращо се в град Джинхуа, Китай.

Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Към момента на представянето на дисертационния труд, част от резултатите са оформени в 3 научни публикации, от които една е в списание с импакт фактор - Applied Sciences и две в реферирани и нереферирани списания с научно рецензиране. Посочените работи напълно удовлетворяват изискванията на Правилника за прилагане на Закона за развитие на академичния състав в ССА за защита на дисертация.

Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Към рецензирания дисертационен труд нямам съществени критични бележки и препоръки, но имам въпроси:

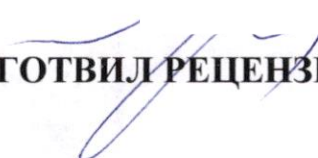
1. Как е определена хитиназната активност на щам-продуцента *Bacillus subtilis*?
2. Счита ли, докторантът че провежда оптимизиране на състава на хранителните среди?
3. Къде са представени данни от проведените микробиологични анализи, посочени на стр. 91?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на приложените от докторанта, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Въз основа на гореизложеното предлагам да се присъди на **Николай Янков Солаков** научната степен “доктор” в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, докторска програма „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“

Дата: 11.08.2023 г.


ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:

REVIEW

on a dissertation work for obtaining the scientific degree "Doctor" in the field of higher education 5. Technical sciences, professional direction 5.12. Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)"

Topic and author of the dissertation: "Development of technology for bioproducts based on organic sources", by Assistant Nikolay Yankov Solakov.

Member of the scientific jury: Prof. Angel Ivanov Angelov, PhD University of Food Technology, 5.11. Biotechnology, order appointing the scientific jury RD 05-75/22.05.2023

Brief introduction of the PhD student

Nikolay Yankov Solakov was born on 30.07.1969. In 2014, he obtained a bachelor's degree in "Medical Chemistry" at the Faculty of Chemistry of Plovdiv University "Paisiy Hilendarski", and in 2015 he obtained a master's degree in "Medical Chemistry". Food Chemistry" at the same university. During his studies, he also demonstrated entrepreneurial skills and participated in the development, implementation and control of technological processes in the production of food products, as well as in other development activities in the food industry. Since January 26, 2017, he has been enrolled in part-time doctoral studies at the Institute of Cryobiology and Food Technologies, at the SSA. During this period, the doctoral student participated in the development of new products for conducting experimental production and in conducting a number of instrumental methods of analysis. For his scientific work, he was awarded twice with a Diploma in a competition for innovations in the "Scientific Activity and Developments" section of the "AGRA" International Exhibition.

The doctoral student has a good command of written and spoken English. He has very good computer skills in the use of Microsoft Office application programs, working with specialized software for statistical processing SPSS Statistics and with specialized databases with scientific literature.

General characteristics of the dissertation and abstract - volume and structure

The dissertation submitted to me for review is written in 168 standard pages. Its structure covers the sections: Introduction – 3 pages, Literature review – 47 pages, Conclusions from the literature review – 3 pages, Aim and tasks – 1 page, Materials and Methods – 26 pages, Results and discussion – 40 pages. , Conclusions – 3

pages, Main contributions – 3 pages, References – 20 pages and scientific publications and participation in conferences and projects.

The work is aimed at developing a technology for obtaining bioproducts based on organic sources - higher medicinal mushrooms *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*. The set goal and planned tasks fully correspond to the doctoral program claimed by the doctoral student "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)" from professional direction 5.12. Food Technologies.

The Literature Review of the dissertation successively examines and analyzes scientific publications on:

- ✓ Application of various types of higher fungi as sources of biologically active substances to obtain functional bioproducts for medical and nutritional purposes - world experience.
- ✓ Cultivation methods of wild mushrooms - types of food substrates and cultivation conditions.
- ✓ Biotechnological methods for obtaining biologically active extracts from higher fungi.
- ✓ Methods for obtaining stable intermediate forms (intermediate raw material for subsequent input into a final product) of the obtained extracts.
- ✓ Sublimation drying – mechanism of the process and factors affecting the quality of the final product.

The cited literature in its entirety covers 207 literary sources published after 2010, which is undoubtedly proof of the relevance of the developed topic. A very good impression is made by the drawing of Conclusions from the literature review, which provide a basis and guidelines for a very accurate and correct formulation of the goals and tasks that the doctoral student sets for himself in his dissertation work.

On the basis of the literature review, the goal of the dissertation development is also set: development of a technology for obtaining bioproducts based on organic sources. Thus formulated, the goal is clear and precise, targeting four types of medicinal mushrooms and products derived from them to be used to obtain a functional bioproduct "FibrinoZIME. The tasks resulting from this objective are well defined, clear and aimed at proving the set objective of the research.

The "Materials and methods" section describes in detail all used starter cell cultures from higher medicinal mushrooms, the components used in the preparation of the functional product, technological (laboratory and semi-industrial) and analytical methods, the conditions and the equipment for HPLC necessary for the analysis of the biologically active substances.

The "Results and Discussion" section is central to the dissertation. It covers about 40 pages, richly illustrated with tables and figures. The doctoral student has reflected the experimental work he has carried out with great precision and analytical approach. The beginning of the section is devoted to a large volume of work related to the cultivation of cell culture of higher medicinal mushrooms *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* in liquid medium. It makes a good impression that the PhD student applies state-of-the-art cultivation techniques and determines the rate of mycelial growth by measuring the volume of undigested culture medium. Several compositions of the nutrient medium were experimented, and based on the results obtained from the experiments, the doctoral student is motivated to continue his further work with the nutrient medium M2 containing potato starch, peptone, yeast extract, glucose, FOS, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, Vitamin B₁, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , FeSO_4 for mycelium cultivation of the higher fungi mentioned above. The results obtained from these experiments are represented by figures and summarized in tables, which undoubtedly helps to follow them more easily.

In the next stage, the PhD student proved that the mycelium growth when cultivating the four medicinal mushrooms on a solid medium was observed between the 30th and 90th day, with the best result for all the studied mushrooms being reported in the S2 medium, which is an added carbon source rice.

Logically, the cultivation processes are completed by carrying out a semi-industrial method of cultivating a *Cordyceps militaris* cell culture to obtain a fruiting body and a high cordycepin content. A total of four types of starting raw materials were obtained for extracts to be put into final dosage forms. Under these cultivation conditions, the total amount of substrates in the system in medium IM1 increased by 27.5%, and in medium IM2 - by 51%.

An innovative approach in the doctoral student's research is the release of biologically active substances from the cell and cell wall, without the use of organic solvents, but with treatment with enzymes and microbial cultures to break down the structures of the cell, which takes place in a temperature range of 18-20°C. For this task, the doctoral student used as raw material a living mycelium of *Ganoderma lucidum*, which contains over 400 types of biologically active substances. The enzymes laccase, lipase, alpha amylase, cellulase, chitinase were used to break down the cell wall, and fermentation with *Bacillus subtilis* was also carried out. Degradation of the cell wall was established by microscopic observation, and chromatographic analysis demonstrated the presence of glucosamine, which is conclusive evidence for the degradation of the chitin layer of the cell wall of the fungal cells.

An essential part of the dissertation is the proof of the presence of biologically active substances - derivatives of cordycepin and adenosine, peptides of different molecular mass, phenolic and antioxidant compounds in extracts from the mycelium of *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and the fruiting body of *Cordyceps militaris*. It is known that derivatives of cordycepin and adenosine have pronounced therapeutic properties related to increasing the energy of the cell, improving the cellular immune response, protecting cardiovascular activity, etc. It was found that the concentration of cordycepin and adenosine derivatives in the sample of *Cordyceps militaris* cultivated in a nutrient medium with an optimized composition reached 2.22% and 0.64%, which is an increase compared to the control medium by 1.9% and 0.24%.

The last part of the dissertation work is related to the development of a new functional product - "FibrinoZIME", for which a formulation was formulated and a technology for its production was created. It makes an excellent impression that the doctoral student applies an innovative approach, which is related to the use of the combined action of various enzymes with fibrinolytic action, which differ in molecular mass (from 10 to 110 kDa) and have the ability to degrade fibrin and amyloid protein, such as thus significantly reducing the pathogenic effect caused by the accumulation of plaques in the tissues.

The abstract of the dissertation work, which is 48 pages long, fully meets the requirements of the Regulations for the Implementation of the Law on the Development of the Academic Staff in the AA, fully covering the following sections of the dissertation work: Introduction, Conclusions from the literature review, Aim and tasks, Materials and Methods, Results and Discussion, Main Conclusions, Contributions, List of publications and participation in scientific forums of the PhD student on the topic of the dissertation.

Actuality of the problem

The use of wild higher mushrooms to maintain good health and treat disease has existed since ancient times in Asian regions, while the rest of the world this approach is considerably more recent. In recent years, there has been an increased interest in their use not only as a functional food, but also in the form of nutritional supplements, nutraceuticals and mycotherapeutic products. Higher mushrooms are a rich source of biologically active substances that can be used as ingredients in the production of functional products from the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Medicinal mushrooms are known to have a number of pharmacological actions such as antimicrobial, anti-inflammatory, immunomodulatory, antidiabetic, cytotoxic, antioxidant, hepatoprotective, anticancer, antiallergic,

prebiotic, etc. properties. Currently, no more than 10% of the known fungal organisms are well studied, which provides a huge opportunity for conducting scientific research in this area, as well as obtaining biologically active extracts for use in various areas of the economy and agriculture. In this global context, the direction chosen by the PhD student and his scientific supervisors is extremely modern, up-to-date and closely related to practice and its needs for the development of new functional foods based on wild mushroom extracts.

Literary awareness and theoretical preparation of the candidate

The doctoral student shows with the present work a very good level of knowledge and mastery of the studied subject. Based on the solid literature review on the topic of the dissertation, the doctoral student has comprehensively presented the state of the problems of the application of combined biotechnological approaches for the use of biologically active components from natural organic sources. The importance of searching for solutions and undertaking activities related to the creation of a new technology is shown, in which the nutrient medium for cultivating the microbial strain-producer *Bacillus subtilis* is part of the composition of the final product and is a source of proteolytic, fibrinolytic, cellulase, glucanase, chitinase enzymes and other biologically active components.

Methodical approach

The materials and methods section of the conducted research is presented clearly and graphically and includes a description of the steps and stages of the development. I accept as justified and reasonably selected the approach for detailed presentation of the research design. The research methods, data sources and materials used are correctly selected. The sources of information are described in detail, and this justifies the representativeness and significance of the results and the conclusions drawn. Knowing and using modern analytical methods confirms the conclusion about the significance and validity of the studies, as well as the attitudes towards independent research work of the doctoral student. I believe that the methodical apparatus used is sufficiently comprehensive, it allows the achievement of the set goal and the realization of the tasks of the research. In order to achieve the completion of the dissertation work, the goal and tasks have been definitely fulfilled. As a result of the conducted research, I assume that the doctoral student has mastered basic scientific methods and techniques.

Thesis contributions

I believe that the dissertation work thus developed and presented for evaluation is significant with the results achieved in the extremely current topic of research and creation of new functional products. Contributions are defined as scientific,

scientific-applied and applied. I believe that the work on this dissertation led to the following more significant contributions:

- ✓ The presence of biologically active components (adenosine derivatives (cordycepin), peptides with different molecular mass, phenolic profile and antioxidant activity) in extracts from mycelium of *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and fruiting body of *Cordyceps militaris* has been experimentally proven.
- ✓ The main parameters of the sublimation drying process of mycelium from *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and fruiting body from *Cordyceps militaris*, as components of the composition of functional bioproduct "*FibrinoZIME*" have been established.
- ✓ A semi-industrial method for the production of mycelium and fruiting body from higher medical mushrooms - *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on a solid nutrient medium was experimentally applied, and the content of *Cordycepin* extract, *Adenosin* and its derivatives was increased by 5.25 times compared to standard methods for production.
- ✓ The semi-industrial production parameters of *Cordyceps militaris* under real conditions in a medicinal mushroom farm with an extract production plant located in Jinhua City, China were established.

Publication activity and evaluation of the quality of scientific publications

At the time of the presentation of the dissertation work, part of the results have been formed in 3 scientific publications, one of which is in a journal with an impact factor - Applied Sciences and two in refereed and non-refereed journals with scientific review. The specified works fully satisfy the requirements of the Regulations for the Implementation of the Law on the Development of the Academic Staff in the SSA for the defense of a dissertation.

Critical notes, questions and recommendations to the candidate

I have no significant critical comments and recommendations for the peer-reviewed dissertation, but I do have questions:

1. How the chitinase activity of the producer strain *Bacillus subtilis* was determined?
2. Does the PhD student consider that he is optimizing the composition of the nutritional environments?
3. Where data from the microbiological analyzes carried out, indicated on page 91, are presented?

CONCLUSION:

Based on the various research methods applied by the doctoral student, the experiments correctly carried out, the summaries and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of the LDASRB and the Regulations on the terms and conditions for acquiring scientific degrees and for occupying academic positions in the AA, which gives me a reason to rate it **POSITIVELY**.

On the basis of the above, I propose to award to **Nikolay Yankov Solakov** the scientific degree "doctor" in the field of higher education 5. Technical sciences, professional direction 5.12. Food technologies, doctoral program "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)"

Date: 11.08.2023

REVIEWER:

Prof. Dr. Angel Angelov