

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ
СОФИЯ
Вх. № <u>KT1-136</u>
<u>21-08</u> - <u>2023</u> г.

СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „доктор” в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност „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“ от ас. Николай Янков Солаков

Член на научното жури: доц. д-р Светла Максимова Дянкова, Институт по криобиология и хранителни технологии - София, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“, Заповед за назначаване № РД 05-75 / 22.05.2023 г. на Председателя на ССА.

I. Актуалност на проблема

В последните десетилетия се наблюдава засилен интерес към изолирането и изследването на природни съединения с физиологично действие, които биха могли да имат благоприятен ефект при терапията и профилактиката на много социално значими заболявания. Тази тенденция доведе до преоткриване и задълбочено проучване на редица биологични суровини, използвани в традиционната медицина като възможни източници на биоактивни вещества.

Докато лечебния потенциал на растенията е емпирично познат от векове и е обект на множество научни изследвания, в България съществува много по-малко информация за действието и приложението на медицинските висши гъби, които са широко използвани в традиционната китайска медицина. Недостатъчно проучени са и възможностите за прилагане на биотехнологични методи за получаване на физиологично активни екстракти от висшите гъби в достъпна и лесноусвоима форма. От тази гледна точка разработвания в дисертацията проблем е безспорно актуален в научно и научно-приложно отношение. Актуалността на темата е добре обоснована във въведението и обширния литературен обзор. Разгледани са 17 вида медицински гъби и са подбрани 4 вида, известни с най-високо съдържание на биологично активни вещества. Оптимизирана е технологията на култивирането им в лабораторни и полупромишлени условия. Иновативен момент в дисертационния труд е приложеният метод на ферментация на гъбения субстрат с щам продуцента *Bacillus subtilis*, който дава възможност за хидролизиране на клетъчните структури в гъбната суровина и пълно освобождаване на биоактивните компоненти.

II. Цел, задачи и методи на изследване

За постигане на поставената цел в хода на работата по дисертационния труд докторантът е формулирал 8 конкретни задачи.

Използваният за изследване материал е оригинален и включва клетъчни култури от медицинските гъби *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*. Методите, подбрани за изпълнението на дисертацията са научно-обосновани, наред със стандартните са приложени и съвременни аналитични техники, включително високоефективна течна хроматография. Поради естеството на дисертационния труд, особено внимание е обърнато на технологичните методи. Проведени са множество експерименти за култивиране на подбраните диворастящи висши гъби. Много подробно са разгледани етапите за размножаване на стартерните клетъчни култури в течна (фаза 1) и твърда (фаза 2) хранителна среда и начините за получаване на висок добив мицелна маса и плодно тяло. Чрез вариране състава на хранителните среди е постигнато оптимизиране на процеса. Допълнително са направени опити за култивиране на щам *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 в подобрени хранителни среди с цел увеличаване на специфичната ензимна активност. За екстрахиране на биологично активните вещества от гъбния субстрат са приложени два метода - хидролиза с ензимен комплекс и ферментация с получения щам-продуцент *B. subtilis* с висока протеолитична и хитиназна активност. Етапите от технологичния процес са онагледени с ясни и подробни блок-схеми. Много добро впечатление прави, че след лабораторно установяване на оптималните условия за отглеждане на *Cordyceps militaris* са проведени експерименти при полупромишлени условия във ферма за медицински гъби в град Джинхуа, Китай, като получените биоактивни екстракти са анализирани и оценени.

Приложените аналитични методи съответстват на формулираните задачи. Методите са описани достатъчно подробно, за да се осигури бъдещо възпроизвеждане. За тези, които са общо приети и широко използвани е цитирана подходяща литература.

III. Нагледно представяне и интерпретация на получените резултати. Използвана литература.

Получените резултати са представени в 11 таблици и 18 фигури и са обобщени в 10 извода. Те съответстват на целта и задачите на дисертационния труд. Със снимков материал подробно е онагледено развитието на мицела от изследваните медицински гъби в течна и твърда хранителна среда. Установени са обогатените хранителни среди и времеви диапазон, при които се постигат най-добри резултати. При експериментите с щам *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 е наблюдавано нарастване на броя жизнеспособни клетки и повишаване на специфичната ензимна активност чрез внасяне в състава на хранителната среда на прахообразни екстракти от *Cordyceps sinensis* и *Ganoderma lucidum*. Получената бактериална култура успешно е използвана за разграждане на клетъчната стена на гъбната маса, което е доказано с микроскопско наблюдение и хроматографски методи. Съдържанието на Cordycepine и Adenosin в екстракт от *Cordyceps militaris*, култивиран в

хранителна среда с оптимизиран състав, е значително по-високо в сравнение с пробите, култивирани в хранителна среда със стандартен състав. Анализите за съдържание на фенолни вещества и антиоксидантна активност също показват най-добри резултати при екстракта от плодно тяло на *Cordyceps militaris*, отглеждан индустриално по оптимизиран метод. Като логичен резултат от извършената експериментална работа е формулиран състав и е създадена технология за получаване на функционален биопродукт, съдържащ екстракти от изследваните медицински гъби.

Приложената библиография е по темата на дисертацията и включва 207 броя литературни източници, като значителна част от тях е от последните 15 години. Литературният обзор е добре структуриран и завършва с изводи, от които се формулират целта и задачите на дисертационния труд.

IV. Приноси на дисертационния труд

В резултат от работата по дисертацията ас. Солаков е формулирал 4 научни, 10 научно-приложни и 2 приложни приноса. Научните и научно-приложните приноси могат да се обобщят в 3 основни направления: 1) оптимизиране на режимите на култивиране на изследваните медицински гъби; 2) получаване на водни екстракти с високо съдържание на биологично активни вещества, чрез хидролиза с комплекс от ензими или ферментация с *Bacillus subtilis* като продуцент с насочена протеолитична и хитиназна активност; 3) експериментално установяване на основните параметри на процеса сублимационно сушене на свежите мицели и екстрактите. Въз основа на резултатите от лабораторните експерименти е направено полупромишлено внедряване на технологията за продуциране на мицел и плодно тяло от *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* върху твърда хранителна среда, като е постигнато значително увеличение на количеството на Cordycepin, Adenosin и неговите производни в екстракта в сравнение със стандартните методи за производство.

По принцип приемам основните приноси, посочени от докторанта, като считам, че научно-приложни приноси 8 и 10 могат да се обединят.

V. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Ас. Солаков е включил 3 публикации по темата на дисертацията. Две са реферирани в Scopus или Web of Science, като една от тях е в издание със SJR 0.492 (2022). Общият брой точки е 46.66, което покрива и превишава минималните национални изисквания съгласно ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав на ССА за придобиване на образователна и научна степен „доктор”. Докторантът е посочил 4 участия в национални научни конференции. Разработеният въз основа на дисертацията нов функционален продукт - „FibrinoZIME” е представен на Международната селскостопанска изложба Агра 2020 и е награден в конкурса за иновации, раздел „Научна дейност и разработки”.

VI. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Към представения дисертационен труд нямам съществени критични бележки и препоръки, тъй като направените предложения за промени на предварителното разглеждане

са взети под внимание от ас. Солаков. Имам бележка от технически характер, която се отнася до следното: Ако резултатите в таблици 13, 14, 15, 18 и 19 са представени като средни стойности $\pm$ стандартно отклонение, то това трябва да бъде упоменато в заглавието на таблицата или като допълнение под нея.

Имам следния въпрос към докторанта: на стр. 122 и в Таблица 22 е посочено, че в състава на функционалния продукт „FibrinoZIME” е включен ферментирал свеж мицел от 4 медицински гъби - *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*. Какво е съотношението между отделните компоненти?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на приложените от докторанта методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за развитие на академичния състав в ССА, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Въз основа на гореизложеното предлагам на почитаемото Научно жури да се присъди на ас. Николай Янков Солаков образователната и научна степен „доктор” в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“.

Дата: 15.08.2023 г.

ИЗГОТВИЛ СТАНОВИЩЕТО:

/доц. д-р Светла Дянкова/

OPINION

on a dissertation work for obtaining the educational and 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 (including enzymes, hormones, proteins)".

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

Member of the scientific jury: Associate Professor Svetla Maksimova Dyankova, Ph.D, Institute of Cryobiology and Food Technologies - Sofia, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)", according to Order No. RD 05-75 / 22.05.2023 of the Chairman of the Agricultural Academy.

I. Actuality of the problem

In recent decades, there has been an increased interest in the isolation and research of natural compounds with physiological action, which could have a beneficial effect in the therapy and prevention of many socially significant diseases. This trend has led to the rediscovery and in-depth study of a number of biological raw materials used in traditional medicine as possible sources of bioactive substances.

While the healing potential of plants has been empirically known for centuries and is the subject of numerous scientific studies, in Bulgaria there is much less information about the action and application of medicinal higher mushrooms, which are widely used in traditional Chinese medicine. The possibilities of applying biotechnological methods for obtaining physiologically active extracts from higher fungi in an accessible and easily digestible form are also insufficiently studied. From this point of view, the problem developed in the dissertation is undeniably relevant in a scientific and scientific-applied sense. The actuality of the topic is well justified in the introduction and extensive literature review. Seventeen species of medicinal mushrooms were examined and four species known to have the highest content of biologically active substances were selected. The technology of their cultivation in laboratory and in semi-industrial conditions has been optimized. An innovative approach in the dissertation work is the applied method of fermentation of the mushroom substrate with the *Bacillus subtilis* strain, which enables the hydrolysis of the cell structures in the mushroom raw material and the complete release of the bioactive components.

II. Purpose, tasks and research methods

To achieve the set purpose, the doctoral student has formulated 8 specific tasks.

The material used for the research is original and includes cell cultures from the medicinal mushrooms *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps*

militaris. The methods selected for the implementation of the dissertation are scientifically based, along with the standard, modern analytical techniques, including high-performance liquid chromatography, are applied. Due to the nature of the dissertation work, special attention is paid to technological methods. Numerous experiments were conducted to cultivate the selected wild higher fungi. The stages for propagation of the starter cell cultures in liquid (phase 1) and solid (phase 2) nutrient medium and the ways to obtain a high yield of mycelium and fruiting body are discussed in great detail. By varying the composition of the nutrient media, optimization of the process was achieved. Additionally, attempts were made to cultivate *Bacillus subtilis* strain NBIMCC 2353 in improved nutrient media in order to increase the specific enzyme activity. To extract the biologically active substances from the mushroom substrate, two methods have been applied - hydrolysis with an enzyme complex and fermentation with the obtained strain-producer *B. subtilis* with high proteolytic and chitinase activity. The stages of the technological process are illustrated with clear and detailed flowcharts. It makes a very good impression that after establishing the optimal conditions for growing *Cordyceps militaris* in the laboratory, experiments were carried out under semi-industrial conditions in a medicinal mushroom farm in Jinhua City, China, and the resulting bioactive extracts were analyzed and evaluated. The applied analytical methods correspond to the formulated tasks. The methods are described in sufficient detail to ensure future replication. For those that are generally accepted and widely used, appropriate literature is cited.

III. Illustrative representation and interpretation of the obtained results. References.

The obtained results are presented in 11 tables and 18 figures and summarized in 10 conclusions. They correspond to the purpose and tasks of the dissertation work. The development of the mycelium of the studied medicinal mushrooms in liquid and solid nutrient media is illustrated in detail with photographs. The enriched nutrient media and time range at which the best results are achieved have been identified. In experiments with *Bacillus subtilis* strain NBIMCC 2353, an increase in the number of viable cells and an increase in specific enzyme activity are observed by adding powdered extracts of *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma lucidum* to the composition of the nutrient medium. The resulting bacterial culture is successfully used to degrade the cell wall of the mushroom mass, which is proven by microscopic observation and chromatographic methods. Cordycepine and Adenosin content in *Cordyceps militaris* extract cultured in medium with optimized composition is significantly higher compared to samples cultured in medium with standard composition. Analyzes for the content of phenolic substances and antioxidant activity also showed the best results for the extract of *Cordyceps militaris* grown industrially by an optimized method. As a logical result of the performed experimental work, a composition is formulated and a technology is created to obtain a functional bioproduct containing extracts from the studied medicinal mushrooms.

The attached bibliography is on the subject of the dissertation and includes 207 references, a significant part of which is from the last 15 years. The literature review is well structured and ends with conclusions from which the purpose and tasks of the dissertation are formulated.

IV. Contributions of the dissertation work

As a result of the work on the dissertation, assistant professor Solakov formulated 4 scientific, 10 scientific-applied and 2 applied contributions. The scientific and scientific-applied contributions can be summarized in 3 main directions: 1) optimization of cultivation regimes of the studied medicinal mushrooms; 2) obtaining water extracts with a high content of biologically active substances, by hydrolysis with a complex of enzymes or fermentation with *Bacillus subtilis* as a strain-producer with specific proteolytic and chitinase activity; 3) experimental establishment of the main parameters of the freeze-drying process of fresh mycelium and extracts. Based on the results of the laboratory experiments, a semi-industrial implementation of the technology for the production of mycelium and fruiting body from *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on a solid nutrient medium was made, achieving a significant increase in the amount of Cordycepin, Adenosin and its derivatives in the extract compared to standard production methods.

In general, I accept the main contributions indicated by the doctoral student, considering that scientific-applied contributions 8 and 10 can be combined.

V. Publication activity and evaluation of the quality of scientific publications

Asst. Prof. Solakov has included 3 publications on the topic of the dissertation. Two are referenced in Scopus or Web of Science, and one of them is in a journal with SJR 0.492 (2022). The total number of points is 46.66, which covers and exceeds the minimum national requirements according to the Act on development of the academic staff in the Republic of Bulgaria and the Regulations for the development of the academic staff of the Agricultural Academy for the acquisition of the educational and scientific degree "Doctor". The doctoral student has indicated 4 participations in national scientific conferences. The new functional product developed on the basis of the dissertation - "FibrinoZIME" was presented at the International Agricultural Exhibition Agra 2020 and was awarded in the competition for innovations, section "Scientific activity and developments".

VI. Critical notes, questions and recommendations to the candidate

I have no significant critical remarks and recommendations for the presented dissertation, since the proposed changes to the preliminary examination have been taken into account by Asst. Prof. Solakov. I have a technical note regarding the following: If the results in Tables 13, 14, 15, 18 and 19 are presented as means $\pm$ standard deviation, then this should be mentioned in the table title or as an appendix below it.

I have the following question for the doctoral student: on page 122 and in Table 22 it is stated that the composition of the functional product "FibrinoZIME" includes fermented fresh mycelium

of 4 medicinal mushrooms - *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*. What is the ratio between the individual components?

CONCLUSION:

Based on the research methods applied, the correctly conducted experiments, the summaries and conclusions made, I consider that the presented dissertation meets the requirements of the ADASRB and the Regulations for the development of the academic staff of the Agricultural Academy, which gives me a reason to evaluate it **POSITIVELY**.

Based on the above-mentioned, I propose to the honorable Scientific Jury to award Assistant Professor Nikolay Yankov Solakov the educational and 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 (including enzymes, hormones, proteins)".

15.08.2023 г.

MEMBER OF THE JURY:


/Assoc. Prof. Svetla Dyankova, PhD/