

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната 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 на биопродукти на основата на органични източници, Николай Янков Солаков*

Член на научното жури: проф. д-н Цонка Иванова Годжевъргова, Университет „Проф. д-р Асен Златаров“, Бургас, Научна специалност „Технология на биологично-активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“, заповед за назначаване на НЖ – РД 05-75 от 25.05.2023 г.

I. Кратко представяне на докторанта

Николай Солаков завършва средно образование през 1984 г. в ЕСПУ „Димитър Благоев“, гр. Пловдив. Образователно квалификационна степен „Бакалавър“ получава през 2013 г. в ПУ „Паисий Хилендарски“, специалност Медицинска химия. През учебната 2012-2013 г, той завършва СДК курс „Инструментален анализ“ и получава професионална квалификация: специалист по високоефективна течна хроматография. На следващата година, той получава ОКС „Магистър“ по научна специалност „Хранителна химия“, професионална квалификация: химик – хранителна химия. Очевидно е, че с последните два образователни избора, ясно се очертава бъдещата насоченост и интереси на Николай Солаков. От 1996 до 2018 г. той работи в две фирми Голд Таймс 1 ЕООД и Биофикс ЕООД като консултант в сферата „Развойна дейност в хранително-вкусовата промишленост“. От 2018 г. до момента той е асистент-докторант в „Института по криобиология и хранителни технологии“. Николай Солаков е придобил допълнителна квалификация като е завършил през 2019 г. курс „Въвеждане и вътрешни одитори на НАССР системата и етикетиране и определяне енергийната стойност на храните“, към Съюза по хранителна промишленост – София. Съществена част от творческата автобиография на Николай Солаков са неговите две участия в международното изложение „АГРА 2019 и АГРА 2020, където представените иновационни биопродукти LyoCRUNCH и

FibrinoZIME са отличени и наградени с диплом. Докторантът извършва активна научно-изследователска работа и доказателство за това е неговото участие в 4 научни форуми и 7 научно-изследователски проекти.

II. Обща характеристика на дисертацията и автореферата – обем и структура

Дисертационният труд съдържа всички необходими раздели - въведение, литературен обзор, материали и методи, резултати и обсъждане, обобщени изводи, литература и приложение 1, общо 168 страници. Цитирани са 207 литературни източника (1 на кирилица и 206 на латиница). В дисертацията са включени 22 таблици и 31 фигури. Литературният обзор обхваща 51 страници. В него са обхванати абсолютно всички въпроси, които са в тясна връзка с експерименталната част: приложение на различни видове висши гъби като източници на биологично активни вещества, методите за култивиране на диворастящи висши гъби, различните биотехнологични методи за получаване на биологично активни екстракти от висши гъби и методи за получаване на стабилни междинни форми на получените екстракти. Обърнато е специално внимание на сублимационното сушене – механизъм на процеса и фактори, влияещи върху качеството на крайния продукт. Много добре са описани предимствата и недостатъците на контролираното лабораторно отглеждане на медицински гъби и на контролираното отглеждане при естествени условия. Накрая докторантът е направил изводи от литературния обзор и е посочил в каква насока ще се развива дисертационния труд и кои са новите елементи в него. Авторефератът отговаря на дисертационния труд и е много добре оформен, така че да даде ясна представа за него.

III. Актуалност на проблема

Основната цел на дисертационния труд е разработване на технология за получаване на биологично активни комплекси от диворастящи висши гъби и микробиални култури и включването им във функционален продукт с насочено здравословно действие. Темата е актуална, тъй като медицинските гъби са ценен източник на биологично-активни вещества и в последните години се разработват редица биопродукти от тях. Приложени са интересни комбинирани биотехнологични подходи за получаване на функционалния продукт, съдържащ екстракти от висши медицински гъби с избрана биологично активна насоченост. Осъществено е комбинирано използване на гъбни и микробиални екстракти с цел подобряване биологично активното действие на крайния продукт. Създадена е нова технология, при която хранителната среда за култивиране на микробиалния щам е част от състава

на крайния продукт и е източник на протеолитични, фибринолитични, целулазни, глюканазни, хитиназни ензими и други биологично активни компоненти.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

От направеният литературен обзор и още повече от направените изводи към литературния обзор съм убедена, че кандидатът има много добра литературна осведоменост и теоретична подготовка. На базата на събраната информация кандидатът се ориентира към 4 вида медицински гъби - *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*, за които е известно какви биологично активни вещества продуцират. Забелязва се стабилна теоретична подготовка по отношение на култивирането на медицинските гъби, използваните хранителни среди, оптимизиране на условията за култивиране, екстрахирането на биологични активните вещества, използваните биотехнологичните методи за получаване на биологично активни екстракти от висши гъби и методите за получаване на стабилни междинни форми на получените екстракти. Кандидатът има много добра теоретична подготовка по отношение на сублимационното сушене, а бих допълнила и практична подготовка, тъй като работи в Института по криобиология и хранителни технологии, който има значителни успехи в тази област.

V. Методичен подход

Определено може да се констатира, че методичният подход при разработването на дисертационния труд е много добър. Подбрани са 4 вида медицински гъби - *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*, продуциращи ценни биологично активни вещества. За да се получи по-голям процент биологично активни вещества с определена биологична насоченост, кандидатът обръща внимание на оптимизирането на условията на култивиране на медицинските гъби. За постигането на тази цел вариран е състава на хранителната среда и са проведени експерименти за култивиране на мицелни култури в течна и твърда среда, в лабораторни и полупромишлени контролирани условия. При направеното сравнение ясно се очертават предимствата и недостатъците на всеки метод. Разработени са биотехнологични методи за хидролиза на висшите гъби чрез използване на готови ензимни комплекси и ферментация чрез директно използване на живи клетки от щам продуцента *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353. Значително внимание е отделено на оптимизиране на хранителната среда за култивиране на *Bacillus Subtilis* NBIMCC 2353 с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки и увеличаване на общата

протеолитична и хитиназна активност. Приложени са адекватни и съвременни аналитични методи за доказване наличието на биологично активните компоненти – HPLC за доказване на производните на аденозин (кордицепин), електрофоретични анализи за доказване на получените пептиди с различна молекулна маса и спектрофотометрични методи за определяне на фенолен профил и антиоксидантна активност в мицелна култура от изследваните висши гъби в различни етапи от развитието им. На базата на получените резултати и тяхната интерпретация са определени оптималните условия осигуряващи постигане на желаната биологична активност на биопродукта. Накрая на дисертационния труд е предложена технология за разработване на функционален продукт, съдържащ екстракти от висши медицински гъби с избрана биологично-активна насоченост и по този начин е осъществена оригинална практическа завършеност на дисертационния труд.

VI. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи

Без съмнение получените резултати са значими. Създадена е нова технология за получаване на функционален продукт с насочено здравословно действие. Резултатите са убедителни, защото при търсенето на оптималните условия за култивиране, непрекъснато се прави качествено и количествено сравнение на получените биологично-активни вещества при култивиране в течна и в твърда среда, при лабораторно и полупромишлено култивиране, при вариране на хранителната среда. Направено е сравнение на хидролизата на висши гъби чрез използване на готови ензимни комплекси и ферментация чрез директно използване на живи клетки от щам продуцента *Bacillus subtilis*. Приложени са подходящи съвременни методи за доказване на биологичната активност на биопродукта. Интерпретацията на резултатите е достоверна. Много добре е изяснено при какви условия може да се получи екстракт с висока антиоксидантна активност, или екстракт с висока ензимна активност, или екстракт с високо съдържание на *Cordycepin* и *Adenosin*. Изводите на дисертационния труд са добре оформени, подкрепени с конкретни данни.

VII. Приноси на дисертационния труд

Дисертацията е с научни, научно-приложни и приложни приноси. Тя отразява една много добра завършеност на един научен продукт – от лабораторните експерименти, през полупромишлените експерименти до изработване на нова технология и готов продукт с регламентирани критерии. Разбира се дисертацията има научни приноси, но най-впечатляващото в нея

е, че се вижда крайната цел на една научна идея, а именно нейната реализация в практиката.

Научно-фундаментални приноси

1. Оптимизирана е хранителната среда за култивиране на висши медицински гъби, така че процесът на култивиране да е насочен към продуциране на пептиди с насочено ензимно действие и продуциране на по-висок процент производни на аденозин.
2. Установен е оптималния компонентен състав на хранителната среда за култивиране на щам *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки и увеличаване на общата протеолитична и хитиназна активност.
3. Доказано е наличието на биологично активни компоненти - производни на аденозин (кордицепин), пептиди с различна молекулна маса, техния фенолен профил и антиоксидантна активност в екстракти от мицел на *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и плодно тяло от *Cordyceps militaris*.

Научно-приложни приноси

1. Разработен е метод за продуциране на свеж мицел в сферична форма от висши медицински гъби (*Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*) в течна хранителна среда с добавяне на специфични белтъчини, хитин с цел получаване на високо съдържание на биологично активни пептиди с насочено ензимно действие и по-лесното му отделяне от течната фаза на културалната среда.
2. Разработен е метод за продуциране на мицел от висши медицински гъби (*Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*) върху твърда хранителна среда, обогатена с ориз с цел получаване на високо съдържание на биологично активни полизахариди (β – глюкани) и трикратно съкращаване на времето на култивиране на мицелната култура.
3. Приложен е 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.
4. Доказано е, че *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 е подходящ щам продуцент за ензимно смилане на гъбен субстрат от свеж мицел, успешно може да

замести използването на готови ензимни комплекси и да се приложи в производството на разработвания функционален продукт.

5. Разработен е метод за култивиране на щам продуцента *Bacillus Subtilis* с цел увеличаване броя на жизнеспособните клетки и продуцирането на ензими с различна молекулна маса, чрез оптимизиране състава на хранителната среда с добавяне на промишлено получен екстракт от *Ganoderma lucidum* и *Cordyceps sinensis* с високо съдържание (40%) на β – глюкани.

6. Формулиран е рецептурен състав и е разработена технология за производство на функционален продукт - „FibrinoZIME” с физиологична насоченост към разграждане на фибринов и амилоиден белтък.

3. Приложни приноси

1. Разработена е технологична схема за производство на плодно тяло и екстракт от *Cordyceps militaris* с повишено съдържание на Cordycepine.

2. Установени са параметрите на полупромишлено производство на *Cordyceps militaris* в реални условия във ферма за отглеждане на медицински гъби и с предприятие за производство на екстракти, намиращо се в град Джинхуа, Китай.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Обемът на получените експериментални резултати е голям, но не всички резултати са публикувани. Чувства се, че интересът и силата на докторанта е в приложната част. Докторантът представя три научни публикации. Получените резултати, относно получаването на биологично активни екстракти от изследваните медицински гъби чрез ферментация с *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 са публикувани в реномираното списание *Applied Sciences*, 2022 с IF 2.838, което е убедително доказателство за качеството на публикацията. Резултатите в тази публикация показват ясна тенденция на увеличаване на съдържанието на кордицепин и аденозин в проба от *Cordyceps militaris*, отгледана в културална среда с оптимизиран състав. Докторантът е представил още две статии, едната публикувана в реферирано списание *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, а другата в нереферирано списание *International Journal of Development Research*. На базата на тези три публикации докторантът има 56,66 точки. Заедно с дисертационният труд точките са 106,66 и напълно се покриват минималните национални изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научната степен „Доктор“ на ССА.

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Към докторанта имам една незначителна забележка. В литературния обзор в таблици (1,2) и фигури (9,10) би било добре да се преведат на български наименованията на активните съединения и означенията, независимо, че са взети от литературни източници, които са цитирани.

Имам няколко въпроси:

1. От Таблица 21. Компонентен и количествен състав на функционален продукт *FibrinoZIME* се вижда, че са включени мицел от *Ganoderma lucidum* и плодно тяло от *Cordyceps militaris*, а в рецептурния състав в Приложение 1, те липсват. Защо сте се отказали от тях?
2. Какви са намеренията ви за производството на функционалната добавка – вие ли ще получавате гъбния мицел и плодното тяло или от Китай ще ги внасяте. Те по вашите оптимизирани условия за култивиране ли ще работят или по стандартна тяхна методика?
3. Има ли изисквания за физиологична активност, безвредност и микробна стабилност в цитирания от вас Регламент ЕС 2018/1023, точно за използвания мицел от 4-те вида медицински гъби и за плодно тяло на *Cordyceps militaris*?
4. Имате ли разрешение от Агенцията по безопасност на храните за производство и разпространение на хранителната добавка?

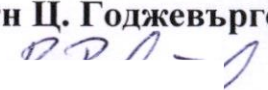
ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

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, научна специалност „Технология на биологично-активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“.

Дата: 14.09.2023

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:

/проф. д-н Ц. Годжевъргова/


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 of bioproducts based on organic sources, Nikolay Yankov Solakov*

Member of the scientific jury: Prof. DSc Tsonka Ivanova Godzhevergova, University "Prof. Asen Zlatarov, Ph.D.", Burgas, Scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)", order of Director of the Agricultural Academy RD 05-75 dated 25.05.2023.

I. Brief presentation of the author of the dissertation

Nikolay Solakov graduated from secondary education in 1984 at the "Dimitar Blagoev" USVS, Plovdiv. Educational qualification "Bachelor" was obtained in 2013 at PU "Paisii Hilendarski", specialty Medicinal Chemistry. During the academic year 2012-2013, he completed the qualification course "Instrumental analysis" and received a professional qualification: specialist in high-performance liquid chromatography. The following year, he received a Master's degree in the scientific specialty "Food Chemistry", professional qualification: chemist - food chemistry. It is obvious that with the last two educational choices, the future direction and interests of Nikolay Solakov are clearly outlined. From 1996 to 2018, he worked in two companies Gold Times 1 Ltd and Biofix Ltd as a consultant in the field of "Development in the food industry". From 2018 to the present, he is a PhD assistant at the "Institute of Cryobiology and Food Technology". Nikolay Solakov has acquired an additional qualification by completing in 2019 the course "Introduction and internal auditors of the HACCP system and labeling and determining the energy value of foods", at the Food Industry Union - Sofia. An essential part of Nikolay Solakov's creative autobiography is his two participations in the international exhibition "AGRA 2019 and AGRA 2020", where the presented innovative bioproducts LyoCRUNCH and FibrinoZIME were honored and awarded with a diploma. The doctoral student carries out active scientific research work and his participation in 4 scientific forums and 7 scientific research projects is proof of this.

II. General characteristics of the dissertation and author's summer of dissertation - volume and structure

The dissertation contains all the necessary sections - introduction, literature review, materials and methods, results and discussion, summary conclusions,

literature and appendix 1, a total of 168 pages. 207 literary sources are cited (1 in Cyrillic and 206 in Latin). The dissertation includes 22 tables and 31 figures. The literature review covers 51 pages. It covers absolutely all questions that are closely related to the experimental part: application of various types of higher mushrooms as sources of biologically active substances, methods of cultivation of wild growing higher mushrooms, various biotechnological methods for obtaining biologically active extracts of higher mushrooms and methods for obtaining stable intermediate forms of the resulting extracts. Special attention is paid to freeze drying - process mechanism and factors affecting the quality of the final product. The advantages and disadvantages of controlled laboratory cultivation of medicinal mushrooms and controlled cultivation under natural conditions are very well described. Finally, the doctoral student drew conclusions from the literature review and indicated the direction in which the dissertation will develop and what are the new elements in it. The abstract corresponds to the dissertation work and is very well designed so as to give a clear idea about it.

III. Relevance of the studied problem

The main goal of the dissertation work is to develop a technology for obtaining biologically active complexes from wild-growing higher fungi and microbial cultures and their inclusion in a functional product with a targeted health effect. The topic is topical, as medicinal mushrooms are a valuable source of biologically active substances and in recent years a number of bioproducts have been developed from them. Interesting combined biotechnological approaches were applied to obtain the functional product containing extracts of higher medicinal mushrooms with selected biologically active targeting. A combined use of fungal and microbial extracts was carried out in order to improve the biologically active effect of the final product. A new technology has been created in which the nutrient medium for cultivating the microbial strain 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.

IV. Literary knowledge and theoretical competence of the candidate

From the literature review and even more from the conclusions drawn to the literature review, I am convinced that the candidate has a very good literary awareness and theoretical training. Based on the collected information, the candidate focuses on 4 types of medicinal mushrooms - *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*, which are known to produce biologically active substances. A solid theoretical preparation is noted regarding the cultivation of medicinal mushrooms, the nutrient media used, the optimization of cultivation conditions, the extraction of

biologically active substances, the biotechnological methods used to obtain biologically active extracts from higher mushrooms and the methods for obtaining stable intermediate forms of the resulting extracts. The candidate has a very good theoretical background in freeze-drying, and I would add practical background as he works at the Institute of Cryobiology and Food Technology, which has significant success in this field.

V. Methodical approach

It can definitely be stated that the methodical approach in the development of the dissertation work is very good. 4 types of medicinal mushrooms were selected - *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*, producing valuable biologically active substances. In order to obtain a greater percentage of biologically active substances with a certain biological focus, the applicant pays attention to the optimization of the cultivation conditions of medicinal mushrooms. To achieve this goal, the composition of the nutrient medium was varied and experiments were conducted to cultivate mycelial cultures in liquid and solid medium, in laboratory and semi-industrial controlled conditions. The comparison clearly outlines the advantages and disadvantages of each method. Biotechnological methods have been developed for the hydrolysis of higher fungi by using ready-made enzyme complexes and fermentation by directly using living cells of the producer strain *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353. Considerable attention has been devoted to optimizing the culture medium for *Bacillus Subtilis* NBIMCC 2353 in order to increase the number of viable cells and an increase in total proteolytic and chitinase activity. Adequate and modern analytical methods were applied to prove the presence of the biologically active components - HPLC to prove the adenosine derivatives (cordycepin), electrophoretic analyzes to prove the obtained peptides with different molecular mass and spectrophotometric methods to determine the phenolic profile and antioxidant activity in micellar culture of the investigated higher fungi in different stages of their development. Based on the obtained results and their interpretation, the optimal conditions ensuring the achievement of the desired biological activity of the bioproduct were determined. At the end of the thesis, a technology was proposed for the development of a functional product containing extracts of higher medicinal mushrooms with a selected biologically active focus, and in this way an original practical completion of the thesis was realized.

VI. Significance and persuasiveness of the obtained results, interpretations and conclusions

Undoubtedly, the results obtained are significant. A new technology has been created to obtain a functional product with a targeted health effect. The results are convincing, because in the search for the optimal conditions for cultivation, a qualitative and quantitative comparison of the obtained biologically active substances is constantly made in cultivation in liquid and in solid medium, in laboratory and semi-industrial cultivation, in varying nutrient medium. A comparison was made between hydrolysis of higher fungi using ready-made enzyme complexes and fermentation using live cells of the producer strain *Bacillus subtilis*. Appropriate modern methods are applied to prove the biological activity of the bioproduct. The interpretation of the results is reliable. It is very well understood under what conditions an extract with high antioxidant activity, or an extract with high enzyme activity, or an extract with a high content of Cordycepin and Adenosin can be obtained. The conclusions of the dissertation work are well formed, supported by specific data.

VII. Dissertation Contributions

The dissertation has scientific, scientific-applied and applied contributions. It reflects a very good completion of a scientific product - from laboratory experiments, through semi-industrial experiments to the development of a new technology and a finished product with regulated criteria. Of course, the dissertation has scientific contributions, but the most impressive thing about it is that it shows the ultimate goal of a scientific idea, namely its implementation in practice.

Scientific-fundamental contributions

1. The nutrient medium for cultivating higher medicinal mushrooms is optimized so that the cultivation process is aimed at producing peptides with targeted enzyme action and producing a higher percentage of adenosine derivatives.
2. The optimal component composition of the nutrient medium for the cultivation of *Bacillus subtilis* strain NBIMCC 2353 was established in order to increase the number of viable cells and increase the total proteolytic and chitinase activity.
3. The presence of biologically active components - derivatives of adenosine (cordycepin), peptides with different molecular mass, their phenolic profile and antioxidant activity in extracts from the mycelium of *Ganoderma neo-japonicum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* and the fruiting body of *Cordyceps militaris* has been proven.

Scientific and applied contributions

1. A method was developed to produce fresh mycelium in spherical form from higher medicinal mushrooms (*Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*) in a liquid nutrient medium with the addition of specific proteins, chitin in order to obtain a high content of biologically active peptides with targeted enzymatic action and its easier separation from the liquid phase of the culture medium.
2. A method was developed for the production of mycelium from higher medicinal mushrooms (*Ganoderma lucidum*, *Ganoderma neo-japonicum*, *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*) on a solid nutrient medium enriched with rice in order to obtain a high content of biologically active polysaccharides (β -glucans) and a threefold reduction in the cultivation time of the mycelial culture.
3. A semi-industrial method was applied for the production of mycelium and fruiting body from higher medicinal mushrooms (*Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*) on a solid nutrient medium, achieving an increase in the content of Cordycepin, Adenosin and its derivatives 5.25 times compared to standard methods for production.
4. It has been proven that *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 is a suitable producer strain for enzymatic digestion of fungal substrate from fresh mycelium, it can successfully replace the use of ready-made enzyme complexes and be applied in the production of the developed functional product.
5. A method was developed for cultivating the producer strain *Bacillus Subtilis* in order to increase the number of viable cells and the production of enzymes with different molecular mass, by optimizing the composition of the nutrient medium with the addition of an industrially obtained extract of *Ganoderma lucidum* and *Cordyceps sinensis* with a high content (40%) of β -glucans.
6. A formulation was formulated and a technology was developed for the production of a functional product - "FibrinoZIME" with a physiological focus on the degradation of fibrin and amyloid protein.

Applied Contributions

1. A technological scheme was developed for the production of the fruiting body and extract of *Cordyceps militaris* with an increased content of Cordycepine.
2. The semi-industrial production parameters of *Cordyceps militaris* under real conditions in a medicinal mushroom farm and an extract production plant located in Jinhua City, China were established.

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

The volume of experimental results obtained is large, but not all results have been published. It is felt that the interest and strength of the PhD student is in the applied part. The PhD student presents three scientific publications. The obtained results regarding the preparation of biologically active extracts from the studied medicinal mushrooms by fermentation with *Bacillus subtilis* NBIMCC 2353 were published in the renowned journal Applied Sciences, 2022 with IF 2.838, which is a convincing proof of the quality of the publication. The results in this publication show a clear trend of increasing cordycepin and adenosine content in a sample of *Cordyceps militaris* grown in a culture medium with an optimized composition. The PhD student has presented two more articles, one published in a refereed Journal of Mountain Agriculture on the Balkans and the other in a non-refereed International Journal of Development Research. Based on these three publications, the PhD student has 56.66 points. Together with the dissertation work, the points are 106.66 and fully cover the minimum national requirements of the Law on Acquisition of Scientific Degrees and the Regulations for the conditions and procedures for acquiring the scientific degree "Doctor" of the Agricultural Academy.

IX. Critical notes, questions and recommendations to the candidate

I have one minor remark about the doctoral student. In the literature review in tables (1,2) and figures (9,10), it would be good to translate into Bulgarian the names of the active compounds and the designations, regardless of the fact that they are taken from literary sources that are cited.

I have a few questions:

1. From Table 21. "Component and quantitative composition of functional product FibrinoZIME", it can be seen that mycelium from *Ganoderma lucidum* and fruiting body from *Cordyceps millitaris* are included, and in the recipe composition in Appendix 1, they are absent. Why?
2. What are your intentions for the production of the functional supplement - will you receive the mushroom mycelium and the fruiting body or will you import them from China. Will they work under your optimized cultivation conditions or their standard methodology?
3. Are there requirements for physiological activity, harmlessness and microbial stability in the EC Regulation 2018/1023 you quote, exactly for the mycelium used from the 4 types of medicinal mushrooms and for the fruiting body of *Cordyceps millitaris*?

4. Do you have permission from the Food Safety Agency to manufacture and distribute the food supplement?

CONCLUSION:

On the basis of 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 Law on Acquisition of Scientific Degrees and the Regulations for the terms and conditions for acquiring scientific degrees and for holding academic positions in the Agricultural academy, which gives me reason to evaluate it **POSITIVELY**. Based on the above, I propose to award Nikolay Yankov Solakov the scientific degree "Doctor" in the higher education area 5. Technical sciences, professional field 5.12. Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)".

Date: 14/09/2023

THE REVIEW WAS PREPARED BY:

/Prof. DSc Tzonka Godjevargova/
T. Godjevargova