

Riikliku programmi "Põllumajanduslikud rakendusuringud ja arendustegevus aastatel 2004–2008" lisa 6

PROJEKTI LÕPPARUANNE⁵

1. VALDKONNA NIMETUS: Seenekasvatus

2. PROJEKTI NIMETUS: Meditsiiniliste makroseente kasvusubstraadi biotehnoloogia

3. PROJEKTI NIMETUS inglise keeles: Medicinal mushrooms growth substrate biotechnology

4. PROJEKTI KESTUS **Algus:** 22.märts 2006 **Lõpp:** 05.12.2008

5. PROJEKTI TÄITJA: Tallinna Tehnikaülikool, Keemia- ja materjalitehnoloogia teaduskond, Materjaliuuringute Teaduskeskus

Telefon: 620 3152

Aadress: Ehitajate tee 5

Registrikood: : 7774000323, Tehingupartneri kood: TP604201

Pangarekviidid: 10052037382001 Ühispank, kood 401

6. PROJEKTI JUHT:	Urve Kallavus (Ees- ja perekonnanimi)	TTÜ Materjaliuuringute teaduskeskus juhataja, professor, Dr.Habil.Chem. (Ametikoht, teaduskraad)
--------------------------	--	--

7. RAHASTAMISE ALUS:

Töövõtuleping nr3.4-23/79 sõlmitud 22.märtsil 2006

Töövõtuleping nr. 3.4-23/181 03.mai, 2007 - 5.12.2007

Töövõtuleping nr. 3.4-23/21 24. 01.2008 - 5.12.2008

8. PROJEKTI TÄITJAD RAHASTAMISPERIOODI VÄLTEL (üksnes teema rahastamise raames tasustatud töötajad)

A. Projekti põhitäitjad (sh projekti juht):

Ees- ja perekonnanimi	Teaduskraad	Ülesanded projekti täitmisel	Koormus	Personalikulu
-----------------------	-------------	------------------------------	---------	---------------

1. Jaak Kaldma	Teaduste doktor	Projekti täitja, mikro- bioloogiliste tööde ja eksperimentide teostamine	1	213280
2. Tõnu Kurissoo	Magister	Projekti täitja, mikro- bioloogiliste tööde ja eksperimentide teostamine ning patendiuringud	1	159960
Kokku				373240

B. Projektiga seotud abitöötajad:

1.				
2.				
Kokku				

9. PROJEKTI KULUD RAHASTAMISPERIOODIL 700 000 krooni

	Kokku	Kulude jagunemine aastate kaupa			
		Projekti algus 2006	2007	2008	
Töötasud	280000	120000	120000	40000	
Sotsiaalmaks	92400	39600	39600	13200	
Töötuskindlustusmaks	840	360	360	120	
Administreerimiskulud (max 20%)	114800	49200	49200	16400	
Kinnistute, hoonete ja ruumide majandamise kulud (max 20%)	905	905	0	0	
Ostetud teenused	0	0	0	0	
Lähetuskulud	1423	1423	0	0	
Muu erivarustus ja -materjal	15951	11930	1118	2903	
Masinad, seadmed	27074	4882	18715	3477	
Muud kulud	38600	17700	15000	5900	
Kokku	574000	246000	246000	82000	
	126000	54000	54000	18000	
	700000	300000	300000	100000	

Kõiki kulusid põhjendada lisas

10. PROJEKTI ARUANNE (tehtud tööd, saadud uued teadmised ja tulemused jne):

Rakendusuuringu eesmärgiks oli teostada rida materjaliteaduslike ja –tehnoloogilisi ning mikrobioloogilisi uuringuid seenekasvatuseks vajaliku steriilse tooraine (substraatmaterjali) tootmise tehnoloogia omandamiseks.

Uuriti seenekasvatuse peamise riskifaktori – tooraine saastatuse bakterite, hallitusseente ning väheväärtuslike, söödamatute ja ka mürgiste kübarseentega vältimise mooduseid. Kultuurseente kasvatamiseks vajaliku tooraine saastatuse vältimiseks kasutatakse töötlemist kuuma veega või auruga, mis on energiamahukas ning sellest tulenevalt rahaliselt kulukas, aeganõudev ning vähese tootlikkusega tegevus. Tooraine steriliseerimine nõuab kalleid ülerõhu all töötavaid seadmeid ja kuumuskindlat tooraine pakendamise materjali vältimaks tooraine nakatumist hallitusseente või bakteritega seenniidistiku kasvamise ajal enne viljakehade moodustumist. Austerservikute *Pleurotus ostreatus* kasvatamisel põhusubstraadil on toorme pastöriseerimise eesmärgil ka kasutusel 50-55 °C juures läbi viidav termofiilne fermentatsioon. Meie kliimas on termofiilse fermentatsiooni teostamiseks vajalik kasutada välist soojusallikat ning protsess kestab kuni 2 ööpäeva. Termofiilset fermentatsiooni kasutab Eco Seen Viinistul austerservikute kasvatamiseks. Termofiilse fermentatsiooni puuduseks meditsiiniliste seente kasvatamisel on lisaks aega nõudvale termilisele töötlusele veel põhu kasutamine substraadina, mida saab varuda vaid üks kord aastas peale teraviljasaagi koristust ning ökoloogiliselt puhta (pestitsiidide jääkidest ja hallitusseente toksiinidest vaba) toorme hanke ja säilitamise raskus Eesti oludes.

On teada, et kõrget kuumust mittekannatavate meditsiiniliste ja biotehnoloogiliste objektide desinfitseerimiseks kasutatakse mitmeid erinevaid füüsikalisi ja keemilisi meetodeid.

Eeldasime, et analoogilisi tehnoloogiaid oleks võimalik rakendada seenekasvatuseks kasutatava tooraine desinfitseerimisel. Sel eesmärgil **viisime läbi patendiuuringu** nõndanimetatud

külmsteriliseerimise meetodite osas. Patendiuuringu teostamiseks kasutasime interneti Espacenet ja USA Patendiameti andmebaase. Vaatasime läbi järgmised külmsteriliseerimist käsitlevad patendid: Gb869448, US3180740, US3383163, US3440319, US3851436, US3873747, US3908031, US4051059, US4169123, US4169124, US4208443, US4230663, US4437567, US4518585, US4550026, US4591565, US4643876, US4744951, US4756882, US4952370, US4956145, US5200189, US5266338, US5460962, US5667753, US5674450, US5785934, US5788838, US5868997, US5980825, US6010662, US6030579, US6803057.

Loetletud patendikirjelduste seast valisime välja USA patendi nr. 4169123, kus steriliseerivaks kemikaaliks kasutati vesinikülihapendit, mille laguproduktid vesi ja hapnik ei ole toksilised elusorganismidele ega põhjusta seente kultiveerimiseks kasutatava tooraines mürgiste komponentide teket. USA patendis nr. 4169123 kirjeldatud meetodi iseärasusena toimub **vesinikülihapendi** vahendusel läbiviidav steriliseerimine **mikrolaineahjus** temperatuuril alla 80 °C, mis võimaldab pakkematerjalina kasutada odavat polüetüleenkilet. Kirjeldatud meetodit kasutatakse poorsete materjalide steriliseerimiseks, kusjuures mikrolaineahjus kuumutamine peab kestma kauem kui 60 sekundit ning vesinikperoksiidi soovitatav kontsentratsioon jääb vahemikku 0,01 kuni 30 %. Saepuru, hakkepuut, põhk, heintaimed ja teravilja töötlemisjäädgid on poorsed materjalid. Nende mikrolaineahjus kuumutamisel toimub temperatuuri tõus ja vesinikülihapendi aurustumine otseselt materjali sees, mitte üksnes lähtudes pindmisest kihist nagu see toimub autoklaavimisel kõrgendatud rõhul veeauru toimel. Traditsiooniliselt kasutatav meditsiiniliste seente intensiivkasvatuseks sobiva tooraine energeetiliselt kulukas autoklaavimine peab kestma soovitud rõhu saavutamisel vähemalt 2 tundi ning ühe steriliseerimistsükli kestus koos eelkuumutuse, rõhu tõstmise, hoidmise ja alandamisega on 6 tundi. Tööstuslikud autoklaavid on kallid (6 m³ mahuga autoklaavi maksumus on miljon krooni piires), nende pikk töötsükkel piirab tootmise mahtu.

Bioloogiliste materjalide steriliseerimisel vesinikülihapendiga on eelnevalt vajalik inaktiveerida desinfectanti lõhustav ensüüm peroksidaas, mis esineb teadaolevalt kõigis hulkraksete organismide kudedes, kuid mitte bakterites ja seente spoorides [1,2]. Seenekasvatuse eesmärgil on peroksidaasi inaktiveerimise sobivaimaks mooduseks kuumutamine, sest selline moodus ei põhjusta toksiliste ainete kuhjumist toorainesse. Sobivaimaks kuumutamise meetodiks võime pidada saepuru või põllumajanduslike jääkproduktide granuleerimist. Granuleeritava tooraine niiskusesisaldus on soovitatavalt alla 14% ning temperatuur tõuseb granuleerimise ajal kuni 180 °C. Olenevalt seadme tootlikkusest toimub graanulite moodustumine 6-10 sekundi jooksul, see on pidevprotsess ning tänu väikesele niiskusesisaldusele toimub see oluliselt väiksema energiakuluga kui aeganõudev autoklaavimine.

Saepurugraanulite kasutamist meditsiiniliste seente kultiveerimiseks raskendab asjaolu, et kasutusel olevate seadmete ja tehnoloogia puhul saab nende koostises olla vaid 10 % lehtpuude saepuru. Kõrgema lehtpuu saepuru sisaldusega graanulid ei püsi koos ja lagunevad ära. Nimetatud põhjusel teostasime täiendava patendiuringu meditsiiniliste seente kultiveerimise ja selleks kasutatava tooraine töötlemise osas. Vaatasime läbi järgmised **patendikirjeldused**: EP0284421, EP0504142, EP0572671, EP0841002, EP1593300, Md2171f, RU2088107, RU2120731, RU2140729, RU2140730, RU2183056, RU2204236, RU2222179, RU2239983, USPP12928, USPP16294, USPP7339, US1833089, US20020041917, US20020192334, US2003005488, US2005097815, US3996038, US4071973, US4083144, US4083145, US4127965, US4161083, US4333757, US4369253, US4472907, US4534781, US4542608, US4617047, US4637163, US4646466, US4674228, US4722159, US4833821, US4873195, US4874419, US4878312, US4977702, US4987698, US5018301, US5123203, US5291685, US5427592, US5503647, US5538523, US5762928, US5786188, US5934012, US6029394, US6041544, US6073388, US6143549, US6298598, US6334274, US6362397, US6367191, US6372964, US6490824, US6748696, US6833266, US7043874, USPP7105. Jaapani patentide JP1117725, JP1187030, JP1254606, JP2001086858, JP2002084884, JP2084112, JP2186919, JP4071421, JP4209783, JP7087839 osas piirdusime esitatud referaatidega. Edasiseks tööks valisime välja Vene Föderatsiooni patendis RU2140730 kirjeldatud meetodi, mis võimaldab kultiveerida austerservikut *Pleurotus ostreatus* okaspuu toormel. Patendis RU2140730 kirjeldatud meetodi iseärasuseks on kaltsiumhüdroksiidi ja tärklise segu (vahekorras 1:1) kasutamine 1,0-1,5 % ulatuses okaspuu toormest enne selle niiskusesisalduse tõstmist 50-60% ning autoklaavimist 80-90 minuti vältel ülerõhul 150-200 mPa.

Teostatud eksperimentaalsed tööd viisime läbi kütteks kasutatavate saepurugraanulitega, mis olid valmistatud eranditult okaspuude baasil. Esmalt määrasime kindlaks, et saepurugraanulite 60 %-lise niiskusesisaldus saavutamisel suureneb nende maht 5-kordselt. Saadud tulemust arvestasime polüetüleenist kilekottidesse seente kasvatamiseks võetud tooraine pakkimisel. Katseteks võtsime 200 g saepurugraanuleid, paigutasime nad 1,5 liitri mahuga polüetüleenist kilekottidesse või kaanega polüetüleenist kaanega varustatud karpidesse, lisasime 3 g eelnevalt valmistatud kaltsiumoksiidi ja tärklise või kaltsiumoksiidi ja täistera nisujahu segu (vahekorras 1:1). Seejärel immutasime saepurugraanulid 57 ml 0,15 %-lise vesinikperoksiidi lahusega, mis sisaldas 0,5 % karbamiidi täiendava lämmastikuallikana. Polüetüleenkottides või karpides immutatud ja paisunud saepurugraanulid paigutasime mikrolaineahju, kus neid töötlesime 12 minuti vältel 800 W võimsusega. Meie poolt valitud kuumutusrežiim ei kahjustanud polüetüleenist pakkematerjali. Peale immutatud graanulite jahtumist inokuleerisime nad austerserviku *Pleurotus ostreatus* või shiitake *Lentinula edodes* mütseeliga ning sulgesime polüetüleenkotid või karbid õhutihedalt. Seenniidistiku areng toimus erakordselt aeglaselt võrreldes Vene Föderatsiooni patendi nr.2140730 kohaselt autoklaavis töödeldud polüpropüleenkottidesse pakitud sama koostisega saepurusubstraadis, mida olime kasutanud mikrolaineahjus töötlemisel. Sellest tegime järelduse, et hüdrolüüsimata tärklis ei soodusta seene mütseeli kasvu okaspuu toorme kasutamisel. Vesinikperoksiidiga immutatud ja mikrolaineahjus

kuumutatud saepurugraanulitega teostatud katse positiivseks tulemuseks oli tõdemus, et töödeldud materjal ei toiminud saastumist võõra mikroflooraga.

Tulles järeldusele, et hüdrolüüsunud tärklis on tehnoloogiliselt raske kasutada koos vesinikperoksiidiga, otsustasime immutuslahuse koostisse viia puhast sahharoosi või peedisuhkru töötlemisjääki **melassi**, mis on puhtast suhkrust tunduvalt odavam ning sisaldab kergesti omastatavat orgaanilist lämmastikku ja mõningaid B-rühma vitamiine. Nii sahharoosi kui melassi lisasime eelnevalt kirjeldatud immutuslahusele arvestusega, et sahharoosi kontsentratsioon oleks 0,5%. Peale saepurugraanulite immutamist lahustuvaid suhkruid sisaldava vesinikperoksiidi lahusega töötlesime täidetud polüetüleenkotte ja polüetüleenist karpe mikrolaineahjus 12 minuti vältel. Peale jahtumist inokuleerisime substraadi austerserviku ja shiitake mütseeliga. Substraadi läbikasvamine austerserviku ja shiitake mütseeliga polüetüleenkottides toimus puhast sahharoosi kasutatud variantide puhul 25-26 °C juures vastavalt 20 ja 70 ööpäevaga, mis vastab traditsiooniliste substraatide kasutamise kohta antud kirjeldustele. Paksuseinalisest polüetüleenist karpide kasutamise korral oli seenniidistiku areng aeglane, millest järeldasime, et seenniidistiku normaalseks arenguks ei jätkunud piisavalt hapnikku. 5 mikroni paksused polüetüleenkotid lasevad aga hapnikku ja süsihappegaasi läbi, ent samas säilitavad kottides algse niiskusesisalduse [3]. Melassi kasutamisel täheldasime kõikide katsevariantide puhul polüetüleenkottide ja polüetüleenist karpide sisu saastumist hallitusseentega. Peedisuhkru tootmisjääk melass sisaldab polüfenoolseid ühendeid ja 5-valentset lämmastikühendit trimetüülglütsiini (ehk betaiini), mis kergesti oksüdeeruvad vesinikülihapendi toimel. Immutuslahuse valmistamisel melassi lisandiga ei osanud me selle keemilise koostise iseärasustega arvestada ning tõenäoliselt lagunes vesinikperoksiid enne, kui jõudis desinfitseerida toorainet võõrmikrofloorast. Muud põhjust sahharoosi sisaldava melassi lisandi erinevust võrreldes puhta sahharoosi kasutamise saastumise juuresolekul ei saa järeldada, sest mõlema variandi puhul kasutasime kuumsteriliseeritud ja steriilsetes tingimustes jahutatud immutuslahust enne vesinikperoksiidi lisamist.

Esimene katseseeria näitas:

- et **õhukese 5 mikroni paksuse polüetüleenkile kasutamine** võimaldab välistada kalli õhufiltriga varustatud polüpropüleenkottide (ühe 3 liitri mahuga koti orienteeruv maksumus 8 EEK) hankimist;
- desinfitseerivate omadustega **vesinikperoksiidi kasutamine** saepurugraanulite immutuslahuse koostises võimaldab välistada energiamahukat ja suurt ajakulu nõudvat autoklaavimist;
- Lahustuva kergesti omastatava **sahharoosi lisamine** immutuslahuse koostisse soodustab seenniidistiku arengut okaspuu toormest valmistatud saepurugraanulitel.
- **Saepurugraanulite** tootmisel tekkiv kõrge temperatuur (kuni 180 °C) soodustab okaspuude puidus sisalduvate seente kasvu pidurdavate terpeenide aurustumist, mille tõttu saab taolisel substraadil kasvatada selliseid seeni, kes looduslikes tingimustes okaspuudel ei kasva.

Tooraine seenniidistikuga läbikasvamine kestab olenevalt kultiveeritavast seeneliigist kesta 20 kuni 90 ööpäeva, mille tõttu ei ole võimalik teha kiireid järeldusi erinevate kasvutingimuste kohta. Esimese katseseeria tulemused näitasid, et üksnes okaspuusaepuru graanulite kasutus koos 0,5% sahharoosi, 0,3% karbamiidi, 0,1% kaaliumdivesinikfosfaadi, 1% kipsi ja 1,5% lubjakivijahu lisamine ei taga shiitakel ja austerservikul suurte viljakehade moodustumist. Kirjanduse andmetel kasutatakse saepurusubstraadi rikastamiseks shiitake kultiveerimisel orgaanilise lämmastiku allikana nisu-, riisi-, rukki-, oakliisid või odrateri [4, 5, 6]. Varasem praktika on meile näidanud, et teravilja ja nende töötlemisjääkide kasutamine meditsiiniliste seente toorme rikastamiseks põhjustab sageli substraadi saastumist võõrmikroflooraga hoolimata

nõuetekohasest steriliseerimisest kõrgendatud aururõhul ja temperatuuril. Nimetatud põhjusel otsustasime katsetada Jaapani patendis JP1187030 kirjeldatud koostist, kus lehtpuusaepuru osa on 25-30% segus okaspuude saepuruga, kusjuures okaspuude saepuru lisand lühendab seente kasvuaega.

Varasemal alustatud eksperimentaalsete tööde tulemusena veendusime, et kvaliteetsed suurte viljakehadega shiitake seeni on võimalik kasvatada toominga- või lepapakkudel (Lisa, Foto 1). Naturaalne saepuru on väga vaene lämmastikühendite poolest. Selles sisalduva süsiniku ja lämmastiku suhe on 200...500:1, puidukoorest vabades puidulaastudes ja klotsides on see suhe isegi 700:1, kuuseokste hakkes, näiteks, aga 30:1 [7]. Lähtudes nendest andmetest **tegime järelduse**, et looduslikes tingimustes ning kultuurseente kasvatamisel koorega kaetud puupakkudel **seened saavad kasvuks vajalikku lämmastiku ja teisi kasvuaineid eeskätt puidu koorest ja koorealusest kihist**. Tuginedes eeltoodule valmistasime seente kasvusubstraadi mikrolaineahjus 6 minuti vältel eelkuumutatud hekseldatud peenest toorest (60% niiskusesisaldusega) lepavõsast ja okaspuude saepurust valmistatud graanulite (pelletite) segust vahekorras 1:1 ja 1:4. Saadud peenestatud lepavõsa ja saepurugraanulite segu paigutasime 5 mikroni paksustesse polüetüleenist kilekottidesse ning immutasime 0,15%-lise vesinikperoksiidi lahusega saavutamaks 60%-list niiskusesisaldust. Vesinikperoksiidiga immutatud substraadi paigutasime suletud kilekottides mikrolaineahju ja kuumutasime 12 minuti vältel võimsusega 800 W. Peale jahtumist 25-30 kraadini inokuleerisime steriliseeritud substraadi shiitake teramütseeliga ning sulgesime kilekotid hermeetiliselt. 70 päeva möödudes olid substraadiga täidetud kilekotid üleni läbi kasvanud shiitake valge seenniidistikuga, mis liitis lepahekslid ja saepuru kokku ühtseks ploki (Lisa, Foto 2). Substraadi mütseeliga läbikasvamise järel eemaldasime polüetüleenkile. Öhuhapniku juurdepääs tagas tiheda pruunistunud kaitsekooriku tekke seenniidistikuga läbikasvanud saepuruploki (Lisa, Foto 3), mis on kaitseks nakkuste eest ja funktsioneerib nagu puukoor [6,8]. Seenniidistikuga läbikasvanud saepuruplokkide kattumine pruunistunud kaitsekoorikuga kestis meie tingimustes 20 päeva. Kaitsekooriku tekkimise järel uputasime saepuruploki 24 tunniks vette temperatuuriga 10 °C. Viljakehade algmed ilmusid veeprotseduuri järel valgustatud ruumis 3-4 päeval ning saavutasid koristusküpsuse 9. ja 10. päeva vahel (Lisa, Fotod 4 ja 5). Paralleelsetes katsetes, kus pruunistunud kaitsekoorikuga saepuruplokkidel jäi madala temperatuuriga töötlemine teostamata, viljakehade algmeid ei ilmunud.

Läbiviidud katses oli suurimaks üllatuseks asjaolu, et okaspuu toormest valmistatud saepurugraanulite suurem sisaldus substraadis tagas viljakehade arvukama tekke võrreldes substraadiga, kus lepaheksleid ja saepuru oli võrdne massiosa (Lisa, Fotod 6 ja 7). Läbi viidud katseseeria shiitake kultiveerimiseks näitas, et substraadi desinfitseerimine toimub väikeste energeetiliste kulutustega ja selleks saab kasutada okaspuude saepurust valmistatud graanuleid ja purustatud lepavõsa ilma täiendavaid lisandeid kasutamata, mis tõstaksid tooraine maksumust. Väga oluline on ka asjaolu, et toorme komponendid ei sisalda taimekaitsevahendite jääke, mis on oluline seente kasutamisel meditsiinilisel otstarbel.

Käesoleval ajal on Euroopas suurimaks shiitake seente tootjaks Soomes Kesk-Karjalas Rääkkyläs asuv Polar Shiitake Oy, kus tootmismahd ulatub 250 tonnini aastas. 2003 aastal andis Rääkkylä Seenekeskus tööd 47 inimesele, toodangu koguväärtus oli 3,5 miljonit eurot, millest 2 miljonit eurot tuli ekspordist [10].

Eestis toodetakse üle 300000 tonni saepurugraanuleid aastas ning võsastunud alad (sealhulgas perspektiivne energiavõsa) on praktiliselt piiramatult tooraineallikaks seenekasvatuseks. Kui 60% kuivainesisaldusega energiavõsa tuleks enne kütteks kasutamist eelnevalt kuivatada, siis seenekasvatuseks omab märk tooraine teatavaid eeliseid. Meie poolt katsetatud meetod seenekasvatuseks vajaliku toorme desinfitseerimiseks kasutades USA patendis nr. 4169123 toodud põhimõtteid soodustaks oluliselt valmistoodangu omahinna alanemist.

Sõltumata mikrolaine- või raadiolainete sagedusel töötava tööstusliku kuumutusseadme hankimise ja katsetamise võimalusest ning vastava meetodi majandusliku tasuvuse väljaselgitamisest püüdsime edasi arendada R. Rush Wayne poolt välja töötatud meetodit vesinikperoksiidi kasutamiseks seenekasvatuses. Rush Wayne kasutas valdavalt tammepuidust valmistatud saepurugraanuleid seente kasvatamiseks, mida immutas 0,03%-lise vesinikperoksiidi lahusega, mis hävitab vabalt elunevad üherakulised bakterid ja seente eosed. Esimese katseseeria teostuse tulemusena **leidsime, et okaspuu toormest valmistatud saepurugraanuleid on võimalik kasutada seente kultiveerimiseks, kui vesinikperoksiidi sisaldavale immutuslahusele on lisatud kergesti omastatavat süsiniku- ja energiaallikat**, näiteks saharaosi. Valiku saharaosi kasuks tegime seetõttu, et erinevalt saharaosi koostisse kuuluvate monosahhariidide glükoosist ja fruktoosist puudub sellel redutseerimisvõime, mis kiirendaks vesinikperoksiidi lagunemist ilma, et see jõuaks avaldada desinfitseerivat toimet. Edasistes katsetes paigutasime kuivad ajukütteks valmistatud okaspuu toormest valmistatud saepurugraanulid 5 või 20 mikroni paksustesse kilekottidesse ning lisasime sinna kas austerserviku *Pleurotus ostreatus* või marmor-servikheiniku *Hypsizygus marmoreus* mütseeli, mis olid üles kasvatatud steriliseeritud odrateradel. Esimese katseseeria põhjal tegime järelduse, et seente parema saagikuse tagamiseks oleks vaja lisada orgaanilise lämmastiku allikat.

“Meditiiniliste makroseente kasvusubstraadi biotehnoloogia projekti” koostamisel lootsime suurt saagikust tagava seente kasvuks vajalikku granuleeritud substraati valmistada saepurust, kuhu on eelnevalt segatud vajalikud komponendid. 2005. aastal peetud eelläbirääkimistel leidsime väiketootja, kes ise oli väga huvitatud spetsiaalselt seenekasvatuseks sobivate saepurugraanulite tootmisest, sest väljaspool kütteperioodi praktiliselt puudus nõudlus tema toodangu järele, samal perioodil oli aga väga soodsad pakkumised kuiva saepuru osas, mis ei nõudnud täiendavat kuivatamist (st energeetilisi ja rahalisi kulutusi). 2006 aasta keskel oli situatsioon kütteks kasutatavate saepurugraanulite nõudluse osas oluliselt muutunud. Tootja ei olnud enam huvitatud omal kulul saepuru granuleerimisseadme toiteliini doseerimisseadmega täiustama ning käesoleva projekti eelarve koostamisel me ei arvestanud doseerimisseadme täiustamiseks vajalike kulutustega. Mainitud sajaolul teostati 2006 aastal projektiga seotult minimaalseid kulutusi, sest granuleerimisseadme dosaatorliini valmistamine läheks edaspidiste katsete tarvis orienteeruvalt maksma 300000 krooni piires, mis ületab käesoleva aasta eelarve. Sellest tulenevalt otsisime uut moodust substraadi rikastamiseks orgaanilise lämmastiku allikaga. USA patendis nr 6041544 on toodud näide, kus kultuurseente mütseeli kasvatamisel on orgaanilise lämmastiku allikana kasutatud üksnes sulejahu ja süsinikuallikana vanapaberist valmistatud graanuleid.

Sulejahu sisaldab keratiini, mis on vees lahustumatu valk, kuid mida seemed on võimelised omastama. Sulejahu puudumisel otsustasime katsetada kuumas vees lahustuva raskesti laguneva kollageense valgu lisamisega vesinikperoksiidi sisaldava immutuslahusesse saepurugraanulite märgamisel. Kollageense valgulahuse lisamine vesinikperoksiidi lahusesse ei kutsunud esile gaasimullide eraldumist, mis andis lootust, et saame immutuslahusega samaaegselt saepurugraanuleid desinfitseerida ja ka rikastada orgaanilise lämmastikuga. Edasised katsed näitasid, et austerserviku või marmor-servikheiniku mütseeliga nakatatud immutuslahusega töödeldud punsunud saepurugraanulid kattusid seenniidistikuga ning saastumist hallitusseente või bakteritega ei olnud märgata. 14 päeva möödudes arenes 20 mikroni paksuses kilekotis marmor-servikheiniku mütseeliga nakatatud odraterade ümber 20-22 millimeetrise diameetriga seenniidistik 5 mikroni paksuses kilekotis oli vastav näitaja 40-55 mm. Rush Wayne teooriale tuginedes laguneb vesinikperoksiid vegetatiivses seenniidistikuga kokku puutudes seenniidistikus sisalduva peroksidaasi toimel veeks ja hapnikuks. Viimati mainitu on vajalik seente kasvuks. Eri paksusega, ilma õhufiltrita polüetüleenkilest kottides oli seenniidistiku kasvukiirus erinev, mis viitab olulisele erinevusele gaaside läbilaskvuse osas. Nii 20 mikroni kui

ka 5 mikroni paksusega polüetüleenist ilma õhufiltriga kilekottides osutus seenniidistiku areng oodatust aeglasemaks. Selleks võib olla mitu põhjust. Odrateradel üles kasvatatud inokuleerimiseks kasutatud seenemütseel ei olnud adapteeritud vesinikperoksiidi keskkonda taluma. Peale vesinikperoksiidi sisaldava immutuslahuse peale valamist muutusid paljud seenniidistikuga nakatatud odraterad steriilseteks. Halb gaasidevahetus koos tundlikkusega vesinikperoksiidi suhtes võis olla põhjuseks, miks substraadi seenniidistikuga täis kasvamine on võtnud normaalse 20-21 päeva asemel oluliselt pikema aja.

Rakendusuringu senise teostuse käik on näidanud, et meditsiiniliste seente kasvatamiseks vajaliku substraadi desinfitseerimiseks on võimalik kasutada nõndanimetatud külmsteriliseerimise meetodeid. Vastavate meetodite kasutamine vähendab oluliselt substraadi desinfitseerimiseks kuluvat aega võrreldes traditsioonilise töötlemisega kõrgendatud temperatuuril ja aururõhul. Otseselt toiduks kasutamatu tooraine töötlemine külmsteriliseerimise meetodi alandab oluliselt energeetilisi kulusi seente kasvatamisel võimaldades leevendada toiduvalgu defitsiiti, asendada loomseid valke ning varustada meditsiinitööstust odava toorainega mitmete tervisekaitseliste probleemide lahendamisel. Projekti raames on katsetatud mitmeid uudseid tehnoloogilisi võtteid seente kultiveerimiseks sobiva tooraine töötlemiseks, mille kaitsmine kasuliku mudelina või patendina nõuab edaspidist täpsemat analüüsi. Sel põhjusel peame enneaegselt katseandmete publitseerimist erialases kirjanduses või koduleheküljel.

Katsevõimaluste ajalise ja ruumilise piiratuse tõttu otsustati edaspidi koondada tähelepanu ainult ühe kultiveeritava seeneliigi – **shiitake** (*Lentinula edodes*) – kasvatamise tehniliste iseärasuste väljaselgitamisele, et oleks võimalik praktiliselt alustada Eesti tingimustes selle seeneliigi tööstuslikku kasvatamist ja hiljem “step by step” valitud tehnoloogiaid täiustada.

Lähtuti asjaolust, et nõudlus selle seeneliigi järele Euroopa turul on jätkuvalt olemas ning nõudmine ületab pakkumise. Eestis on potentsiaalset tootjatehuvit ja tingimused (turg, tooraine, tööjõud) shiitake tööstusliku kasvatamise jaoks olemas. Siiani on Eestis viljelatud puitlagundavatest seentest vaid austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) ja kuningserviku (*P. eryngii*) kasvatamist väikeses mahus. Shiitake kasvatamise intensiivmeetodil teeb keeruliseks austerservikust palju pikem kasvutsükkel (ca 3 korda) ja vajadus toitainete rikka kasvusubstraadi järele. Shiitake kasvatamise edukus sõltub suuresti asjaolust kui edukalt on lahendatud kvaliteetse kasvusubstraadi valmistamine. Substraadi valmistamise põhiprobleemiks on küsimus, kuidas toitainerikast substraati steriliseerida. Shiitake substraat sisaldab lisandina peale saepuru reeglina 10-20% kliisid.

Tööstuslikult kasutatakse shiitake substraadi steriliseerimiseks traditsiooniliselt autoklaavimist. Substraat autoklaavitakse spetsiaalsetes polüpropüleenist kottides, mis on varustatud seente kasvuks vajaliku õhku läbilaskva bakteriitsidse mikropoorse filtriga. Tootmise teeb kalliks kottide kõrge hind ja autoklaavimine. Tööstuslikud autoklaavid on kallid ja nende läbilaskevõime seab piirid valmistatava substraadi kogusele.

Püstitasime lahendamiseks järgnevad tööülesanded:

1. Alternatiivsete steriliseerimise meetodite kasutamine shiitake substraadi ja selle komponentide steriliseerimiseks.
2. Erinevate shiitake tüvede katsetamine puidugraanulitega substraadil.
3. Shiitake kasvumütseeli kasvatamine erinevatel söötmetel.

Substraadi valmistamiseks kasutati puidugraanuleid, millele oli lisatud standardse komponendina 10-25 % kliisid.

Kõige lihtsam moodus seente kasvusubstraadi valmistamiseks oleks kütteks mõeldud

puidugraanulite kasutamine, lisades neile valmistamise käigus kliisid ja hiljem steriilset vett. Esialgsed katsed näitasid, et peale masinast väljumist on puidugraanulid koheselt kilekottidesse pakendatuna praktiliselt steriilsed ja saastavast mikrofloorast vabad.

Probleem on selles, et seni ei ole meil õnnestunud ühegi Eesti saepuru-graanulitootjaga kokkuleppele jõuda, et valmistada eksperimendi korras väike kogus kliidega segatud graanuleid. Kõigi teadaolevate tootjate tootmismahud on nii suured, et sellise väikese kogusega, mis meile vajalik, ei hakata proovimagi. Olude sunnil läksime teist teed ja valmistasime odra kliidest graanulid firmas, mis toodab "snack" tüüpi graanuleid. Odrakliid andsid end väga hästi granuleerida. Väljakulv tardsöötmega Petri tassile näitas, et kliides peituv mikrofloora hävis granuleerimise käigus täielikult. Püüdsime sama seadmega valmistada ka saepuru graanuleid segatuna kliidega, aga edutult. Käsitsi segati omavahel 80% lehtpuu-saepuru ja 20% odrakliisid, mis lasti läbi granuleerimisseadme. Katse lõppes sellega, et lühikese aja jooksul kittis see segu seadme täielikult kinni, näidates seadme mittesobivust antud otstarbeks.

Edasi püüti kasvatada shiitaket substraadil, mis sisaldas puidugraanuleid, millele oli lisatud 20% odrakliidest valmistatud graanuleid. Graanulid kaaluti kilekottidesse, lisati steriilset vett (kuni 60% veesisalduseni) ja shiitake teraviljal baseeruvat kasvumütseeli.

Eelnevad katsed olid näidanud, et 5 mikroni paksune polüetüleenist kilekott võimaldab piisavat õhuvahetust läbi koti seina, et toimuks seenemütseeli areng ja substraadiga läbikasvamine. Mütseeli kasvukiiruse võrdluseks valmistati substraati kahte tüüpi kottides: tavalistes õhukeseseinalistes kilekottides ja spetsiaalsetes seenekasvatamiseks mõeldud polüpropüleenist gaasivahetust võimaldava filtriga kilekottides. Pakendatava substraadi koguseks võeti kuni 1 kg kuivainet (800g puidugraanuleid+200g odra kliigraanuleid), millele lisati 1000 ml steriilset vett (üldine veesisaldus jääks 50 – 60% vahele). Substraati nakatati shiitake odrateradel kasvatatud seenemütseeliga; kotid keevitati kinni ja inkubeeriti +25°C juures. Substraadi läbikasvamise kiirust hinnati visuaalselt iga 3 päeva tagant.

Katsed näitasid, et tavalises õhukeseseinalises polüetüleenkotis leiab aset substraadi täielik mütseeliga läbikasvamine. Selgus, et esimese 2 -3 nädala vältel erinevused substraadi läbikasvamise kasvukiirustes eri tüüpi kottide vahel olid väikesed. Edasi vahed suurenesid ja substraadi täielikuks läbikasvamiseks filtrita kilekotis kulus rohkem aega (ca 1 nädalal). Ilmselt sõltub mütseeli substraadiga läbikasvamiseks kuluv aeg viimase massist ja väiksema koguse puhul jäävad erinevused kasvukiiruses ka väiksemateks. Milline on optimaalne substraadi kogus filtrita kotis kasvatamisel, tuleb iga substraadi puhul eraldi välja selgitada. Edaspidi oleks vaja üles panna pooltööstuslikke katseid, kus suuremate kottide arvu juures vaadeldakse shiitake tootmise võimalikkust puidugraanulitel ja määratakse seente saagis. Labori tingimustes on raske luua vajaminevaid optimaalseid kasvutingimusi (niiskus, valgus, ventilatsioon, temperatuur), et ajatada suuremas koguses seeni ja teha saagise kohta kvantitatiivseid üldistusi. See on võimalik vaid seeni kasvatavas ettevõttes.

Peroksüädikhappe kasutamine

Kirjandusest on teada, et peroksüädikhape (PAA) leiab laialdaselt kasutamist loomakasvatuses ja toiduainetetööstuses pindade ja ruumide desinfitseerimisel. Võrreldes meie poolt eelnevalt katsetatud vesinikperoksiidiga, loetakse PAA-d efektiivsemaks antimikroobseks vahendiks. Teada on ka asjaolu, et vesinikperoksiidiga ja sellele järgneval mikrolainetega mikroobide töötlemisel (kuumutamisel 60 °C), on sünergiline antimikroobne toime.

Katsetasime PAA antimikroobset toimet substraadi steriliseerimisel L:

a)eraldi,

b)koos mikrolainetöötusega (kuumutamine mikrolaineahjus).

Substraadina kasutati segu lehtpuusaepuru st(80%) ja odrakliidest (20%).

a)PAA-ga töötlemisel immutati substraati PAA vesilahusega, et viia substraadi niiskusesisaldus 60-70%-ni.. Kasutati erinevaid PAA kontsentratsioone(%): 0,03; 0,06; 0,15; 0,20; 0,30.

Substraat pakendati õhukestesse (5 - 7 mikroni paksustesse) polüetüleenkottidesse.

b) eelnevalt PAA lahusega töödeldud substraati kuumutati mikrolaineahjus 80 °C-ni. Selline temperatuur ei kahjusta veel polüetüleenkotte.

Steriilsuse kontrolliks tehti töödeldud substraadist (a ja b variant) väljakülvid maltoosa tardsöötmeaga petri tassidele. Tasse inkubeeriti +25 °C juures.

Töödeldud substraati nakatati shiitake kasvumütseeliga (teraviljamütseel) ja inkubeeriti +25° C juures. Mütseeli kasvu jälgiti 30 päeva ulatuses iga 3 päeva tagant.

Katsetes, kus substraati töödeldi ainult PAA-ga vähenes saastava mikrofloora hulk - lahuse kontsentratsioonil 0,15% PAA-d oli mikroobide kasv täielikult pärssitud. Kombineeritud töötlemisel saavutasime mikroobide kasvu täielikult pärssiva efekti madalamal PAA kontsentratsioonil (0,03 -0,06%), mis näitab, et nende kahe töötuse koostoime omab sünergeetilist antimikroobset efekti. Substraadi steriliseerimiseks vajalik PAA kontsentratsioon oli sõltuvuses saastava mikrofloora hulga toormes, eriti kliides, mis oma toitainerikkusega on mikroobidele heaks kasvulavaks. Proovis suurema mikroobide saastatusega läks vaja ka kõrgemat PAA kontsentratsiooni (0,06%).

Võrreldes meie varasemate katsetega (katsed vesinikperoksiidi ja mikrolainetega) võib öelda, et substraadi steriliseerimine PAA-ga toimub madalamal kontsentratsioonil vastavalt 0,03 % ja 0,06%.

Negatiivse küljena: seenemütseeli töötlemisel PAA-ga mütseeli areng märgatavalt pidurdus. Kui autoklaavitud substraadil algab mütseeli intensiivne kasv juba 3. – 4. päeval peale nakatamist, siis töötlemisel PAA-ga algas mütseeli areng 10.-12 -päeval .

Erinevate shiitake tüvede kasvukiiruses on suuri erinevusi, mis paljudel juhtudel sõltuvad kasutatud substraadi koostisest. Reeglina on intensiivtootmises kasutusel olevad shiitake tüved mõeldud kasutamiseks lehtpuidu toormel .Meie poolt kasutatud puidugraanulid on valmistatud vastavalt tehnoloogianõuetele okaspuidu - kuuse või männi- saepurust (lehtpuu osa jääb alla 10%) ja seega ei ole tegemist eriti sobiliku substraadiga tavalistele shiitake tüvedele. Asjaolu, et okaspuidul substraadi läbikasvamise üldse aset leidis, on positiivne fakt. Mis puutub mütseeli kasvukiirusesse, siis võrreldes lehtpuusaepuruga, on see okaspuidul märgatavalt aeglasem. Katetasime kahte shiitake tüve(üks Jaapani, teine Soome päritolu), millest üks (Jaapani oma) näitas kiiremat kasvu kõigil substraatidel: maltoosa tardsöötmeaga Petri tassil, teraviljal kui puidugraanulitel.

Kirjandusest oli teada, et eksisteerivad shiitake tüved, mis kasvavad eelistatult okaspuidul. Meil õnnestus tellida OÜ Kaupvali vahendusel üks selline tootmises kasutustleidev shiitake tüvi USA-st(nimetasime selle tüve Lego nimeliseks tüveks).Esialgne katsetus Petri tassil maltoosaga tardsöötmele näitas, et võrreldes kahe meil kasutada oleva lehtpuul kasvava shiitake tüvega, on okaspuidul kasvava tüve kasvukiirus mõnevõrra väiksem ja kasv nõrgem (võrreldi agariga

söötmele mütseeliniitide lineaarset kasvu, tihedust ja kõrgust).Ka teraviljal on mütseeli kasvukiirus madalam. Lego tüve katsetamine okaspuidugraanulitel on pooleli. Samuti on meile veel teadmata selle shiitake tüve viljakehade maitseomadused kasvatatuna okaspuidu substraadil.

Mütseel

Shiitake kasvatamisel kasutatakse nakatamiseks kas tahket (tavaliselt teravilja või hirsi nakatamisel saadavat) või vedelat mütseeli. Intensiivtootmisel, nn sünteetilisel substraadil kasvatamisel, eelistatakse suurtootmises vedelmütseeli, kuna seda kulub vähem, nakatamist on hõlpsam läbi viia süstides vedelikku läbi koti seinaga ja substraadi läbikasvamise toimub kiiremini kui tahke mütseeliga. Puuduseks on aktiivse mütseeli lühem eluiga ja kõrged kvaliteedinõuded mütseeli valmistamisel. Vedelmütseeli valmistamiseks kasutatakse fermentereid, kus mütseeli kasv toimub steriilses vedelsöötmes, mida vastavalt vajadusele aereeritakse ja segatakse, et tagada mütseeli rakkude sünkroonne paljunemine. Kogu kasvuprotsess fermenteris on automatiseeritud ja sellise seadme maksumus on küllalt suur.

Saepuru (puidugraanulite) substraadi nakatamisel shiitake mütseeliga tekib märgatav mütseeli kasvu pidurdus, nn adaptatsiooniperiood, sest toimub üleminek ühelt kasvusubstraadilt teisele. Selline mütseeli kasvu pärssimine seoses substraadivahetusega toimub nii teravilja kui vedela mütseeli kasutamisel. Oma töös substraadi nakatamiseks kasutasime mütseeli, mida valmistasime laboris ise. Katsetasime tahke mütseeli kasvatamist mitmetel substraadidel: odral, nisul, rapsi- seemnetel, hirsil. Kõige stabiilsemad ja meid rahuldavad tulemused mütseeli valmistamisel saime odra kasutamisel substraadina, mida hilisemas töös ka põhiliselt kasutasime. Hea kvaliteediga mütseeli saime ka koorimata hirsi ja nisu kasutamisel. Hirsi kasutamisel oli puuduseks asjaolu, et Eestis teda ei toodeta (ja eriti ei kasutata) ning tellimine mujalt suures koguses ei olnud katseperioodil ratsionaalne. Nisu puuduseks oli saadava mütseeli kvaliteedi sõltuvus kasutatava nisu sortimendist. Rapsiseemnete kasutamise puhul oli puuduseks mütseeli aeglane läbikasvamise (kõrge õli- kontsentratsiooni tõttu rapsiseemnetes).

Mütseeli valmistamise tehnoloogia oli järgmine: oder kaaluti ja leotati kuumas vees(95°C) kuni terade veesisaldus tõusis 50 – 60%-ni. Seejärel terad nõrutati, jahutati ja lisati segades kriiti(0,03%) ning kipsi(0,05%), et muuta pH leeliselisemaks ja vähendada terade kokkukleepumist. Terad pakendati kas keermestatava kaanega liitristesse klaaspurkidesse või spetsiaalsetesse, mütseeli kasvatamiseks mõeldud, polüpropüleenist kilekottidesse, mis olid varustatud õhuvahetust võimaldava bakteritsiidse filtriga. Kasutasime Belgia firma **SACO2** spetsiaalseid mikrofiltriga polüpropüleenist kotte. Purgid/pakendid teradega steriliseeriti autoklaavides +131°C juures (2,0at rõhu juures) 1,5h vältel, jahutati ja nakatati mütseeliga. Purke/pakendeid inkubeeriti +25°C juures 3 nädalat kuni substraadi täieliku läbikasvamiseni mütseeliga. Valmis mütseeli säilitati +2 - +5 °C juures.

Austerserviku tootmisest on andmeid (Ufimtsevi patent RU2128422.....), et teradele okaspuidu saepuru ja mineraalsete lisandite lisamine parandab substraadi aereeritavust, tõstab mütseeli substraadiga läbikasvamise kiirust. Sellise mütseeli kasutamine saepurusubstraadi nakatamisel pidi kiirendama läbikasvamist mütseeliga. Mütseeli üleviimisel teraviljalt saepurule toimub substraadi vahetus, mis põhjustab mütseeli kasvu pidurduse - nn adaptatsiooniperioodi. Saepuru eelnev lisamine pidi suurendama ekstratsellulaarsete ensüümide hulka, lühendama adaptatsiooniperioodi ja kiirendama substraadi läbikasvamise kiirust. Panime üles analoogsed katsed shiitake tüvedega, lisades teravilja mütseelile 5-10% okassaepuru graanuleid, et

kontrollida võimaliku positiivse efekti olemasolu shiitake kasvatamisel. Esialgsed tulemused näitavad saepuru lisamise positiivse efekti olemasolu – substraadi mütseeliga läbikasvamise aeg lühenes.

Valmistasime katseliselt ka shiitake vedelmütseeli, lähtudes tulevikuperspektiivist arendada shiitake intensiivtootmist. Omamata vedelmütseeli valmistamiseks vajalikku kallist fermenterit, kasutasime selleks olemasolevat laboriloksutit, mille aetasime termokambrisse. Söötmena kasutasime maltoosa vesilahust, mis villiti kolbidesse ja steriliseeriti autoklaavides +0,8 atm juures 45 min vältel. Nakatamiseks võeti Petri tassilt maltoosaga tardsöötmetel väljakülvatud mütseeli. Kasvava mütseeli aereerimist eraldi ei tehtud ja see toimus läbi vatikorgi, millega kolb suleti. Kuna kasutasime väikeseid vedelike mahte (200ml vedelsöödet), oli võimalik läbi ajada sundaereerimiseta. Selleks, et vedelmütseel moodustaks inkubeerides nakatamiseks sobivaid kerakujulisi vorme, tuli katseliselt reguleerida loksutamise amplituudi ja sagedust.

Vedelmütseeli kasvu iseärasuste üle otsustati Petri tasside tardsöötmele tehtud väljakülvide ja kultuuri mikroskopeerimise alusel. Katsetest selgus, et sellisel lihtsal moodusel on võimalik valmistada aktiivselt paljuneva mütseeli vedelkultuuri. Tuli leppida faktiga, et loksutajal kasvatades ei saavutata fermenteriga võrdväärset kultuuri kasvukiirust, tihedust ja rakkude sünkroonset jagunemist, kuid mis sellele vaatamata võimaldas saada aktiivset vedelkultuuri ja kasutada seda katsetes substraadi nakatamiseks.

Võrreldes mütseeli arengut saepurusubstraadi nakatamisel mütseeli vedelkultuuriga ja tahke mütseeliga, erilist vahet ei täheldatud. Mõlemal juhul ümberkülvil ühelt kasvusubstraadilt teisele mütseeli kasv algsest pidurdus, hiljem aga jätkus kuni substraadi täieliku läbikasvamiseni.

Töö eelmisel etapil leidsime, et puidugraanulitel, millele on lisatud kliigraanuletid ja steriilset vett, on võimalik täiendava steriliseerimiseta (autoklaavimiseta) kasvatada shiitake mütseeli. Substraadi steriilsuse tagas graanulite valmistamise tehnoloogia (materjali läbi kuumutamine). Selle meetodi puuduseks on substraadi komponentide piiratud valikuvõimalus, sest põhitooraine – puidu saepuru – granuleerimise tehnoloogia võimaldab kasutada okaspuitu (90%) ja ainult 10% ulatuses lehtpuitu. Eestis saaks potentsiaalse seente kasvusubstraadina ära kasutada väheväärtuslikku lehtpuitu (näiteks lepa- ja pajuõõsa), metsatööstuse jääke (oksi, puukooort) ning põllumajanduse jääkprodukte (sõklad, põhk). Põhiline probleem seisneb selles, kuidas efektiivselt steriliseerida sellisest toormest valmistatud kasvusubstraati.

Otsides alternatiivseid steriliseerimise võimalusi pöörasime seekord tähelepanu gamma(γ)kiirguse kasutamise võimalustele steriliseerimisel.

Püstitasime eesmärgid:

1. Saada ülevaade gamma kiirguse kasutamisest steriliseerimisel.
2. Selgitada välja gamma kiirgusega steriliseerimise positiivsed ja negatiivsed momendid ning selle meetodi võimalused seente kasvusubstraadi steriliseerimisel.
3. Viia läbi esialgsed katsed shiitake kasvusubstraadi steriliseerimisel gamma kiirgusega.

Ioniseerivat gamma kiirgust hakati kommertseesmärkidel kasutama peale II Maailmasõda. Erinevalt neutronkiirgusest ei põhjusta gamma kiirgus objektis jääkkiirgust (s.t. ahelreaktsiooni). Kiirgusallikana on enamasti kasutatud Co-60 (vähem Cs-137, Ir-192), mille poolestusaeg on 5,27 aastat.

Gamma kiirguse steriliseeriva toime kohta vaadati läbi järgmised patendikirjeldused:

US 528144, US 4798611, US 4066907, US 4481652, US 5400382, US 5008550, US 3496362, US 6635222, US 7189556, US 5530037, US 2904392, US 58275117, US 5577090, US

6897245, US5800542, WO/2006/034157, US 3417239, US 3665183, US4438842, US 4722433, US 4825998, US4890722, US4066907, US 5035858, 6964787, US 4066907, US 6908591, US 5334619, US 3401044, US 3360646, US6946098, US3484253, US5145700.

Töö käigus tutvuti kirjandusega, kus käsitleti gamma kiirgusega steriliseerimist.

Algselt leidis gamma kiirgus kasutamist meditsiinis instrumentaariumi steriliseerimisel.

Hiljem (80-ndatel) hakati gamma kiirgusega steriliseerima ka toiduaineid. Sõltuvalt kiiritamise eesmärgist ja objekti iseärasustest on kasutatud erinevaid doose. Doose mõõdetakse Gray`des (1 Gy = 100 rad = 1 J/kg) või kiloGray`des (1 Kgy = 1000 Gy). Kiirguse doosid jagunevad madalateks (alla 1 KGy), keskmisteks (1 – 10 Kgy) ja kõrgeteks (10 – 50 KGy). Madalaid doose kasutatakse näiteks putukate hävitamiseks, idude pärssimiseks, viljade valmimise edasi lükkamiseks; kõrgemaid doose aga spooride ja roisubakterite inaktiveerimiseks. Tähtis on asjaolu, et keemilise analüüsiga on näidatud, et ioniseeriv kiirgus ei põhjusta toiduainetes toksiliste või kahjulike ühendite teket. Teatakse, et vitamiinid C, A, B1 (tiamiin) ja K on kiirgusele tundlikud (samas on need vitamiinid tundlikud ka steriliseerimisele kõrge temperatuuril).

1997.aastal deklareeris WHO, et toiduainete kiiritamine on ohutu. 2003. aasta seisuga olid toiduainete steriliseerimismeetodi gamma kiirgusega heaks kiitnud 36 maad. Kiirituskeskusi leidub 30 maal, nüüdsest ka Eestis – „Steri”. Vaatamata sellele ei luba kahjuks Euroopa Liidu direktiivid toiduainete steriliseerimisel gammakiirgust kasutada, küll aga kiiritatud toiduaineid sisse vedada!

Võimalust gamma kiirgusega seente kasvusubstraati steriliseerida patendikirjeldustes ei avastatud. Ka kirjanduses puuduvad igasugused viited gamma kiirguse reaalsest kasutamisest seente kasvusubstraadi steriliseerimisel.

Arvame, et kiirguse mitte kasutamise võimalikke põhjusi on mitu:

1. Gamma kiirgusega steriliseerimist teostavaid ettevõtteid on maailmas suhteliselt vähe ja teenuse kättesaadavus halb arvestades seenekasvatavate geograafilist kandepinda. Selle meetodi kasutamine on mõeldav vaid kõrge organiseeritusega suurtootmises.
2. Ioniseeriv kiirgus kui selline tundub enamusele inimestest alateadvuses ohtlikuna (massisühhoos, GMO näide). Meil Eestis näitab seda „Steri” probleem.
3. Võimalik, et kasvusubstraadi kiiritamine mõjub pärssivalt seenemütseeli arengule.
4. Võrreldes teiste steriliseerimismeetoditega võib gamma kiirgusega steriliseerimise teenuse hind osutuda liiga kõrgeks.

Töö käigus valmistasime hermeetiliselt suletud substraadi proovid gammakiirgusega kiiritamiseks, et võrrelda neil seenemütseeli kasvu võrreldes autoklaavimisel steriliseeritud substraadiga.

Kiiritamine gamma-kiirgusega (Co60-ga)

Valmistati ette substraadi proovi. Katsetati erinevaid substraadi komponente ja varieeriti nende protsentuaalset sisaldust. Võimalike substraadi komponentidena katsetati :

lehtpuu (kask) saepuru;okaspuidu (kuusk, mänd) saepurust küttegaanulid; hakkepuu (lepp), mida oli peenestatud purustajaga kahes variandis: a) osakeste diameetriga 20 – 30 mm ja b) 8 – 12 mm ;teaviljakliid; sõklad; purustatud hein; põhk; puukoor (mänd) ; kuivatatud presspärm(S.cerevisiae) ja bioaktivaator.

Katsetati järgmise koostisega substraadi variante:

Koostis\ Variandid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Saepuru(kase)	80	75	85	78	79	75	75	70			75	
Puidugraanulid(okaspuu)												78
Hakkepuit (lepa,jäme frakts.)									80			
Hakkepuit(lepa, peen frakts)										80		
Kliid (odra)	20	25	15	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Puukoor (männi)						5						
Põhk(hakitud)							5					
Hein(hakitud)								10				
Sõklad(odra)											5	
Kuivatatud pärm (S.cerevisiae)					1							
Bioaktivaator*				2								2

Märkus:numbrid tabelis tähistavad koostisosi protsentides;

*bioaktivaator sisaldas: kustutatud lupja (Ca(OH)_2),tärklist, karbamiidi (Co(NH)_2) ja superfosfaati ($\text{CaH}_4(\text{PO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) suhtes:3:3:1:1.

Erinevad katsevariandid kiiritati kinnises kilekotis, millele hiljem lisati steriilset vett (autoklaavitud), et oleks tagatud seene mütseeli arenguks vajalik substraadi niiskus 60 -70%. Enne vee lisamist kontrolliti proovide steriilsust, tehes väljakülvid petri tassidele maltoosaga tardsöötmele. Mikroobse kasvu puudumine tõestas kiiritamise efektiivsust. Kõik substraadi katsevariandid nakatati shiitake (L. edodes) teraviljal kasvatatud mütseeliga, visuaalselt jälgiti mütseeli arengut +25°C juures. Paralleelselt kiiritatud proovidega steriliseeriti substraadi proove ka traditsioonilisel (autoklaavimine ülekuumendatud veeauruga) meetodil, et võrrelda kiiritamise mõju seene mütseeli arengule.

Vaatlustulemused näitasid, et kiiritamise meetodil steriliseeritud substraadil areneb mütseel normaalselt ja võrreldes autoklaavitud substraadiga mingit mütseeli kasvupeetust ei täheldatud.

Substraadi produktiivsuse üle otsustada ei saanud kuivõrd katseteks, mis võimaldaksid seente viljakehade ajatamist, puudusid rahuldavad tingimused (valgus, temperatuur, niiskus, intensiivne sundventilatsioon CO_2 eemaldamiseks). Ajatamata seeni ei ole tänapäeval rahuldavat kriteeriumi, et otsustada substraadi saagikuse üle. Kasutatakse küll sellist meetodit, kus petri tassil mütseeliga läbikasvanud substraadil loendatakse väljakasvanud seenealgeid (primordii)

pinnauhiku kohta. Saadavad arvulised näitajad ei pruugi alati olla vastavuses tegeliku saagikusega. Panime üles sellised katsed, kus püüdsime hinnata primordii arvukust erinevatel substraadidel, usaldusväärseid tulemusi (kvantitatiivseid erinevusi) aga ei saanud.

Kiiritamine Co-60-ga näitas, et:

1) Sõltumata substraadi koostisest ja saastatuse määrast omab kiiritamine efektiivset steriliseerivat toimet substraadile.

2) Pärssiv toime shiitake mütseeli arengule kiiritamisel puudub.

Võttes arvesse Co-60-ga kiiritamise

a) efektiivsust steriliseerimisel,

b) mütseeli arengut pärssiva efekti puudumist,

c) võimalust steriliseerida väga erineva koostisega substraati,

d) kiiritamise maksumust,

tuleb tõdeda, et tegemist on täiesti arvestatava meetodiga seente kasvusubstraadi steriliseerimisel. Sellise steriliseerimismeetodi kasutamine õigustab end selliste seente kasvatamisel, mis on kapriissed, kasvavad aeglaselt, nõuavad toitaineterikast substraati ja mille omahind lõpptulemusena väärib sellist töötlust. Sellist kulutust ei vaja ilmselt Austerserviku (*P.ostreatus*) kasvatamine, seevastu shiitake biotehnoloogia ja turuhind igatahes seda lubavad. Peale shiitake on aga ka rida teisi väärisseneni, mille substraadi steriliseerimisel võiks proovida kiiritamist.

Kasutatud kirjandus:

1. R. Rush Wayne, Growing Mushrooms with Hydrogen Peroxide, Volume I, 1996 (autorilt ostetud käsikirja õigustes).
2. R. Rush Wayne, Growing Mushrooms the Easy Way. Home Mushroom Cultivation with Hydrogen Peroxide, Volume II, 2000 (autorilt ostetud käsikirja õigustes).
3. Spravotshnik po plastitsheskim massam. Tom pervõi. Izdaniye vtoroje, pererabotannoe i dopolnennoje. Pod redaktsii V.M.Katajeva, V.L.Popova, B.I.Sazhina, Izdatelstvo "Himija", Moskva, 1975.
4. Paul Stamets, Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Third Edition. Ten Speed Press, Berkley – Toronto, 2000.
5. Paul Stamets, J.S.Chilton, The Mushroom Cultivator. A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home. Agarikon Press, Olympia, Washington, 1983.
6. Free from Powerty. Mushroom Growers' Handbook 2. Shiitake Cultivation, Published by MushWorld, Seoul, 2005.
7. T. Kurissoo, Kompostimine ja kompost. Iuuaianduse käsiraamat, Varrak, Tallinn, 2005, lk. 123-137.
8. Free from Powerty. Mushroom Growers' Handbook 1. Oyster Mushroom Cultivation, Published by MushWorld, Seoul, 2004.
9. Polar Shiitake Oy <http://www.polarshiitake.com/> (Internetis loetav 29.11.2005).

Seppo Eskelinen, Erikoissieniprojekti poiki yrityksiä.

<http://www.karjalanmaa.fi/cfmldocs/uutinen.cfm?lehti=465&uutinen=2453&arkisto=1>

(Internetis loetav 23.11.2005).

11. LÜHIKOKKUVÕTE (*Summary* - kokkuvõte inglise keeles kuni 2 lk)

Kokkuvõte

Meditiiniliste makroseente kasvusubstraadi biotehnoloogia rakendusuring näitas, et meditsiiniliste seente kasvatamiseks on võimalik kasutada erinevaid põllumajanduse ja metsatööstuse tootmisjääke (saepuru, hakkepuut, puukoor, kliid, põhk, sõklad). Vajaliku substraadi desinfitseerimiseks on erinevaid steriliseerimise meetodeid (granuleerimine, töötlemine vesinikperoksiidiga, peräädikhappega, mikrolainetega, gamma kiirgusega), mis võimaldab omakorda seente kasvusubstraadina efektiivsemalt kasutada erinevaid lähteaineid. Võrreldes traditsioonilise töötlusviisiga kõrgendatud temperatuuril ja aururõhul vähendab nimetatud meetodite kasutamine oluliselt substraadi desinfitseerimiseks kuluvat aega ja ka substraadi töötlemise omahinda. Eriti häid tulemusi annaks gammakiirguse kasutamine - vaatamata lähteainete koostisele ja saastatuse astmele võimaldab see meetod substraati väga efektiivselt steriliseerida. Selline töötlemise puhtuseaste annab aga omakorda võimaluse ära kasutada substraadi valmistamiseks ka selliseid komponente, mille senine töötlemine on olnud tülikas ja ebaefektiivne.

Substraadi pakendamiseks. Seente omahinda vähendab tunduvalt substraadi pakendamiseks õhukeste (5 mikronit) polüetüleenkilekottide kasutamine kallite polüpropüleenkottide asemel. Projekti raames on katsetatud mitmeid uudseid tehnoloogilisi võtteid seente kultiveerimiseks sobiva tooraine töötlemisviisi leidmiseks ning mille kaitsmine kasuliku mudelina või patendina nõuab edaspidist täpsemat analüüsi. Sel põhjusel peame enneagseks katseandmete publitseerimist erialases kirjanduses või koduleheküljel.

Arvame, et projekt täitis ülesande

- seente kasvusubstraadina on leitud ja praktikas järele proovitud erinevaid tootmisjääke,
- kasvusubstraadi steriliseerimiseks on leitud alternatiivseid meetodeid.

Edaspidises uurimistöös oleks vajalik kvantitatiivselt määratleda ühe või teise meetodi mõju seente saagikusele. Labori tingimustes võib küll seeni ajatada, aga kahjuks puuduvad tingimused saagikuse määramiseks tootmisele kohastes optimaalsetes tingimustes. Alustatud projekti on vaja jätkata piloottootmisena, et anda seente tootmiseks praktilisi soovitusi.

Summary

We have become acquainted with cold sterilization methods and with mushrooms cultivation technologies. We find that the cold sterilization method described in US Patent nr. 4169123 is suitable for decontamination of porous medical and surgical products. We find that the described method is suitable for disinfection of mushroom cultivation substrate packed to the polyethylene bags. These kind substrates for medicinal mushrooms cultivation based on wood processing residues. The addition of pure sucrose to the hydrogen peroxide solution for immersion of coniferous sawdust pellets has promoted the development fungal mycelium belonging to the *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Hypsizygus marmoreus* species.

We examined the hydrogen peroxide method for mushroom cultivation described by R. Rush Wayne in more detail. The enrichment of hydrogen peroxide immersion solution with sugar beet molasses had accomplished mushroom substrate infection with molds. The application of

collagen solution as source of organic nitrogen together with hydrogen peroxide solution for coniferous sawdust pellets immersion accomplished with satisfied results.

The tasks to solve were as following:

- Application of alternative methods for the sterilization of substrate and the components.
- Testing of different cultures of shiitake mushroom on the wood pellet substrate.
- Growing of shiitake mycelium on different substrates.

After the test period with several wood degrading mushrooms *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *Lentinula edodes* the work was concentrated on the one species – shiitake. Growing of shiitake with intensive method is complicated due to the long growing cycle (ca 3 times) and the need for rich growing media. Therefore to work out the proper composition of the growing media was one of the most important task.

We find that bags made from thin (5 micron) polyethylene sheets are suitable for substrate package and are more cheaper than special polypropylene bags with filters specialized for mushroom substrate. It was found that the thin-walled plastic bags allow sufficient air circulation through the wall to ensure development of the mycelium of the mushroom. Therefore it is economical to use common thin-walled plastic bags. Only it is important to establish proper quantity of the substrate mass/ volume for each type of the substrate separately as the common time for the growing is longer than in special bags with air filters. After laboratory testing pilot plant experiments has been foreseen.

The second task was to investigate the influence of peroxide/PAA and microwave treatment together. Even adding the peroxide to the substrate diminishes the growth rate it enables to choose for this fungus besides the wood substrate other types of substrates like crop grain.

It was established that PAA and microwave co-treatment have synergetic antimicrobial effect and the sterilization of substrate was obtained on lower concentration than with hydrogen peroxide. The negative point of this method is inhibitory effect on level of mushroom mycelium development.

Different strains of shiitake have very different growth rates on the same substrate. Therefore we tested different mixtures like hardwood and softwood mixtures what are typically unusual. We found that shiitake is able to grow with enough efficiency also on the softwood substrate what is very useful information. In Estonia the main part of the wood originated from the softwood – pine and spruce.

If we use wooden pellets as a substrate substantial depression of the growth takes place after the inoculation. It is caused by the differences in the composition of inoculation mixture and growing substrate. Therefore testing to choose right mixture for the inoculation is still going on. This will shorten the adaptation period after the inoculation of the substrate.

As a conclusion we can ensure that instead of autoclave treatment of the growing substrate one could use the granulation (pellets) of the substrate almost with the same efficiency. Also the usage of common plastic bags instead of expensive special bags with filter is economical. The finding that shiitake is possible to grow on the softwood substrate opens new possibilities to cultivate this medicinal mushroom in Estonia.

The possibilities of alternative sterilization method for mushroom substrate with gamma-

irradiation were studied. The review about literature and patents concerning Co-60 gamma-irradiation for sterilization was prepared.

The mushroom substrate samples were prepared for sterilization with Co-60 irradiation.

Gamma-irradiation (Co60) of substrate samples demonstrated, that all samples were efficiently sterilized and there was not any disincentive influence on subsequent mushroom mycelium development.

12. PROJEKTIGA HAAKUVAD TEADUSTEEMAD, GRANDID, DOKTORI- JA MAGISTRITÖÖD, JÄRELDOKTORITE UURIMISTEEMAD, LEPINGUD, PATENDID:

13. KOOSTÖÖ (lepingud, konverentside korraldamine, töötamine välisriikides jne):

14. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:

15. Teema juht (ees- ja perekonnanimi): Urve Kallavus	Allkiri:	Kuupäev: 01.03.2009
Tellija esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (ees- ja perekonnanimi): Urve Kallavus	Allkiri:	Kuupäev: 01.03.2009

Täidab põllumajandusteaduste nõukogu

Nõukogu esimees:	Allkiri:	Kuupäev:
-------------------------	-----------------	-----------------

Põllumajandusteaduste nõukogu hinnang tehtud tööle: