



**Lõvilakk-korallnarmiku (*Hericium erinaceus*)
seenekultuuride kasvuparameetrite määramine
tööstusliku kasvatamise eesmärgil**

Magistritöö

Üliõpilane: Angelika Sofia Bolkvadze

Üliõpilaskood: 221391KATM

Juhendaja: Allan Olspert, Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Kaasjuhendaja: Siim Raadik, Shroomwell Innovation OÜ, tegevjuht

Õppekava: KATM02/22

Tallinn 2025



Determination of Growth Parameters of Lion's Mane (*Hericium erinaceus*) Fungal Cultures for Industrial Cultivation Purposes

Master's thesis

Student: Angelika Sofia Bolkvadze

Supervisor: Allan Olspert, Department of Chemistry and Biotechnology, senior lecturer

Co-supervisor: Siim Raadik, Shroomwell Innovation OÜ, CEO

Study program: KATM02/22

Tallinn 2025

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Angelika Sofia Bolkvadze

[allkiri 14.01.2025]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Allan Olspert

Kaasjuhendaja: Siim Raadik

[allkiri 14.01.2025]

Sisukord

Autorideklaratsioon.....	3
Lühendid.....	6
Sissejuhatus.....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Seenete kasvatamise tööstus.....	8
1.1.1 Esimesed seente kasvatused.....	8
1.1.2 Seenetööstuse arengu faktorid.....	9
1.2 Seente tootmise globaalne jaotus.....	10
1.2.1 Seente tööstustuslik kultiveerimine.....	10
1.2.2 Kultiveeritavad seened.....	11
1.3 Kultiveeritavad seened.....	12
1.3.2 Seente kultuurid suures tööstuses.....	13
1.3.3 Kultiveeritav lõvilakk-korallnarmik.....	14
1.3.4 Lõvilakk korall narmiku funktsionaalsed omadused.....	15
2 TÖÖ EESMÄRGID.....	17
3. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
3.1 Materjalid ja meetodid.....	18
3.1.1 Materjalid.....	18
3.1.2 LV seenekultuuride käsitlemise protsessid.....	19
3.1.3 LV seenekultuuride kasvu määramine.....	20
3.1.4 pH mõõtmised.....	21
4 Tulemused ja arutelu.....	22
4.1 LV kultuuride kasvuparameetrite määramine.....	22
4.1.1 Kasvuparameetrid MEA tardsöötmele.....	22
4.1.2 Kasvuparameetrid hirsist teramütseelil.....	29
4.1.3 Kasvuparameetrid erinevatel substraatidel.....	34
4.1.4 Substraatide pH ja niiskussisalduse muutus.....	37
Kokkuvõte.....	39
Kasutatud kirjandus.....	43
Lisad.....	47
Lisa 1.....	47
Lisa 2.....	48

Lisa 3.....	49
Lisa 4.....	50

Lühendid

LV - Lõvilakk-korallnarmik (*Hericium erinaceus*)

MEA - linnaseekstrakt agarsööde (*Maltose extract agar*)

Sissejuhatus

Seened omasid suurt tähtsust paljudes kultuurides, olles osa traditsioonilisest meditsiinist, vaimulikest rituaalidest ja sümbolikas tähistasid pikka elu. Kõikides kultuurides leidub märkmeid seente kasutamisest, kuid siiski seente kultiveerimise ajalugu algas iidsest Hiinast ja levis edasi Euroopa ja USA aladele [1].

Tänu suurele huvile söögiseente vastu on hakatud järjest rohkem rajama söögiseente kasvatamiseks mõeldud tehaseid. Lisaks juba 2023. aastaks moodustas tööstuse kogu toodang 44 miljonit tonni ning statistiliste andemete alusel on kultiveerimise ja tarbimise trend kasvufaasis [2]. Antud huvi toetavad teadlikumad toitumisharjumused ja soov tuua uusi maitseid oma toidukordadesse. Lisaks suur panus tuleneb avastatud seente tervisttoetavate omaduste tõttu, mida on püütud implementeerida seente lisandiga jookides, toidulisandites ja snäkkides [3].

Seente kultiveerimine toimub tööstuses järgnevalt: valitud seenekultuuriga nakatatakse steriilne teravili, valmistatakse steriliseeritud substraadid, nakatatakse seeneniidistikku sisaldava teraviljaga ja lastakse seenel läbi substraadi kasvada, viimaseks etapiks on viljumine, mille raames seen kasvatab viljakehad [4]. Kõikide eelnimetatud etappide jaoks peab seenekultuur jõudma küpsusfaasi, et saaks liikuda järgmise etapi juurde. Seega, efektiivse tööstuse jaoks, peavad seenekultuuri omadused olema teada. Kõige tähtsamateks parameetriteks on seeneniidistiku levimise- ehk kasvukiirus ja tootlikus, seene maksimaalne võimekus kasvatada kindlal substraadil kindal koguse seene viljakehasid.

Antud uurimustöö oli valminud koostöös ettevõttega Shroomwell Innovation OÜ. Töö eesmärgiks oli ettevõtte kultuuripangas olevate korallnarmiku (*Hericium erinaceus*) kultuuride omaduste ja kasvuparameetrite määramine erinevates keskkondades ning kultuuride sobivuse hindamine tööstuslikuks seene kultiveerimiseks.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Seenete kasvatamise tööstus

Ajalooliselt on seened olnud tihedalt seotud erinevate kultuuridega. Vana-Egiptuse aegadel ja muistse Hiina tsivilisatsiooni ajal hinnati seeni nende maitse ja meditsiiniliste omaduste tõttu. Egiptlased kujutasid seeni oma hieroglüüfides ning seostasid neid surematusega. Samala ajal, kui Hiina pärandis seostati Reishit (*Ganoderma lingzhi*) pikaelalisuse ja elujõuga. Seened omasid suurt vaimset tähtsust asteekide seas, kes kasutasid neid pühalikes rituaalides ja šamanistlikes praktikates [1].

Hiinas täiustati shiitake (*Lentinula edodes*) seene kasvatamist palkidel ning Jaapanis arendati Matsutake (*Tricholoma matsutake*) kasvatamist. Aasias, kui ka Euroopas muutus šampinjonide (*Agaricus*) korjamine metsast kontrollitud kasvatuseks (Joonis 1) [1]. Seente kasvatamise kultuur arenes iidsetest traditsioonidest süsteemseteks meetoditeks ja sealt edasi suurtööstusteks.



Joonis 1. Vasakul shiitake traditsiooniline kasvatus palkidel [5] ja paremal tööstuslik šampinjonide kasvatus [6]

1.1.1 Esimesed seente kasvatused

Seente kasvatuses esimesed märgmed pärinevad Aasias 6. sajandist, Euroopas 17. sajandist ning USA-s 20. sajandist [2]

Hiinas, Qingyuani maakonna mägedes töötati välja shiitake kasvatamise meetod. Selleks kasutati kohalike lehtpuid, mis olid eelnevalt palkideks saetud ning puuriti augud. Augud täideti seenemütseeliga ning laotati üksteise otsa. Palkid hoiustati metsavarjus, niiskemates ja soojemates kohtades, kuni seente viljakehade tekkimiseni. Selliste palkide pealt sai korjata seeni kuni 7 aastat [7]

Esimesed märgmed Euroopa aladel toimuvast seente kasvatuses pärinevad 17. sajandi Prantsusmaalt, kus Olivier de Serres kirjeldas seda oma toeses *Théâtre de l'Agriculture* [8]. Teoses oli välja toodud, et seentele meeldib sõnniku kuhjades kasvada ning põllupidajad kasutasid selle uue fenomeni ära. Teadlikult moodustati sõnnikust kuhjasid ja vagusid, mida hiljem kasteti

seeneosakesi sisaldava vedelikuga. Kuigi protsess oli halvasti mõistetud, kandis see siiski saaki. 17.sajandi lõpus muutus seente kultiveerimine tasuvaks äriks ning nõ sõnnikuvoodite abil sai kasvatada seeni aastaringselt. 18. ja 19. sajandi edusammudeks olid maa-alused kasvatused koobastes, mis tagasid piisava niiskuse ja temperatuuri taseme [9].

Koobastes ja keldrites kasvatamine levis ka teistesse Euroopa osadesse ning muutus kõike populaarsemaks seente kultiveerimise viisiks, mida kasutati kuni 19.sajandi keskpaigani [9]. See on hea näide sellest, kuidas põllumajanduslikud tegevused võivad vilja kanda, ilma, et tegevuse bioloogilist alust oleks sel hetkel täielikult mõistetud.

USA-s muutus seente kasvatus populaarseks alles 20. sajandil ning esimene seenefarm asutati 1896. aastal Pennsylvanias. Seente kultiveerimine USA-s hakkas arenema alles 1920. aastast, kui Euroopast pärit immigrandid tõid endaga kaasa teadmised ja oskused seente kasvatamisest [9].

1.1.2 Seenetööstuse arengu faktorid

21. sajandil suurenes märgatavalt huvi seente kasvatus vastu, mida toetasid kulinaarsed, meditsiinilised, keskkonna ja toitumiselased aspektid. Antud huvi on andnud seekasvatuse harule võimaluse areneda eraldi tööstusharuks [3].

Rikkalik seente maailm on köitnud paljusid kokki ja toidu entusiaste üle maailma. Seened pakuvad suurt variatsiooni nii maitstes, välimuses kui ka tekstuuris, mis võimaldab neid kasutada hästi paljudes soolastes aga ka magusates toiduroogades [10]. Viimasel ajal on tõusmas ka snäkkide trend, kus püütakse teha seene *jerky*-t või karamelliseeritud magusat seenekrõpsu. Seened on muutunud populaarseks ka jookide sektoris, tänu millele on tõusnud funktsionaalsete jookide turuosakaal [11]. 2022. aastal moodustas (seene komponendiga) funktsionaalsete jookide turu väärtus 2.6 miljardit [12] ning 2023. aastal tõusis see 3.01 miljardini [13].

Seened on köitnud oma toitainelise koostisega, nad on madala kalorsusega, kõrge kiudainete sisaldusega ning nendes leidub vitamiine ja mineraale. Teatud liigid nagu shiitake ja maitake (lehtkõbartorik, *Grifola fondosa*) sisaldavad peale ees nimetatud ka beetaglütkaane, mis toetavad immuunsust [14].

Seente kasvatus on jätkusuutlik ning keskkonnasõbralik põllumajandus haru. Kui võrrelda seente kasvatust traditsioonilise looma- ja põllukultuuride kasvatamisega, vajab see oluliselt vähem ruumi, energiat ja rahalisi ressursse. Lisaks saab seeni kasvatada paljudel põllumajanduslikel kõrvalsaadustel ja saepurul, mis tagab tõhusa ringmajanduse [15].

Lisaks tänu sotsiaalmeediale on seente kasvatus muutunud paljude inimeste hobiks, mida on võimalik realiseerida elades korteris kui ka majas. Korteri jaoks on leiutatud niisutus- ja valgustussüsteemiga karbid ja väiksemad telgid ning majade puhul saab kasvatada seeni saepuruga peenardes, kasvuhoonetes ja keldrites. Kodus kasvatamise teevad eriti lihtsaks juba valmis viljumiseks seene saepurusubstraadid, mida on vaja ainult veega üle pihustada [16]. Internetis pakutakse kursuseid nii algajatele kui ka edasijõudnutele ning palju on tekkinud foorumeid, platvorme ja YouTube kanaleid seente teemal.

Tänu uutele tehnoloogiatele on seente tööstus muutunud efektiivsemaks. Vähem automatiseeritud tööstustes on seente korje ja substraatide käitlemine suur füüsiline töö ning võib moodustada 1/3 kogu tootmiskuludest. Seetõttu, on paljud tööstused investeerinud automatiseeritud lahendustesse nagu seente viljakehade küpsemise andurid, mis määravad millistes piirkondades on seened valmis korjamiseks [17]. Šampinjonide kasvatuses on isegi automaatsed lõikus-ja korjamissüsteemid ning lõigatud seened liiguvad mööda konveiereid pesemisetappi ja edasi pakendamisesse [18]. Antud arendused, kiirendavad seente käitlemise protsesse ning tõstavad tootlikust.

1.2 Seente tootmise globaalne jaotus

Seente tootmine maailmas on alates 2000.aastast suurenenud enam kui viis korda ja 2023. aastaks moodustas kogutoodang 44 miljonit tonni. Jaotuse järgi kasvatatakse Aasias 95% seente kogutoodangust, Euroopas 3% ja USA-s 1% [2]

Aasias domineerival positsioonil on Hiina, mille osakaal moodustab ligikaudu 80% ülemaailmsest toodangust. Lisaks Hiinale on olulised tootjad ka Lõuna-Korea ja Jaapan, kus kasvatatakse rohkem enokit (*Flamulina filiformis*) ja shiitaket [2]

USA ja Kanada juhivad Põhja-Ameerika seente tööstuse turgusid, keskendudes põhiliselt šampinjonidele, mis on turul populaarsed tarbijate eelistuste tõttu. Kanada seente tööstus on samuti märkimisväärne, keskendudes austerservikute, shiitake ja šampinjonide kasvatusele [2].

Euroopas on seente tööstus mitmekesisem, hõlmates seeni nagu shiitake, austerservikuid, šampinjone ja portobellot (aedšampinjon, *Agaricus bisporus*). Globaalsel turul moodustavad vähemuse Lõuna-Ameerika esindajad nagu Brasiilia ja Argentiina, kes alles arendavad oma seente tööstust [19], [20].

1.2.1 Seente tööstuslik kultiveerimine

Kasvatuse tööstuslike protsesse määravad ära seened, mida tööstuses kultiveeritakse, kuid vaatamata sellele saab protsesi üldistada. Allpool on toodud üldistatult Shroomwell seenetööstuse tootmisetapid, mida kasutatakse ka Shroomwell seenetehases. Vastav tootmise skeem on esitatud joonisel 2.

1. Kultuuri kvaliteedikontroll
Kultuuripangast külvatakse tardsootmele seenekultuur ja lastakse mööda söödet levida. Kui kultuur on puhas kasutatakse seda teravilja nakatamisel.
2. Teravilja ettevalmistus
Sõltudes teraviljast sõltub selle ettevalmistus viis. Hirss pestakse läbi, lastakse üle öö ligunema, nõrutatakse, pannakse filterkottidesse ja autoklaavi. Autoklaavitud terviljad nakatatakse valitud kultuuriga ja inkubeeritakse sobilikel tingimustel. Rukkiterade puhul, neid leotatakse üle öö, nõrutatakse ja enne filterkottidesse panemist ning autoklaavimist, terasid keedetakse 15 min. Keetmine aitab peamist rukkiterade kesta pehmeneda.
3. Substraadi valmistamine

Substraadi materjal segatakse kokku ja lisatakse vajalik kogus vett, lastakse seista vähemalt tund aega. Substraadi segu lastakse läbi spetsiaalse masina, mis lükkab substraadi segu kottidesse. Substraadi kotid autoklaavitakse.

4. Substraadi nakatamine

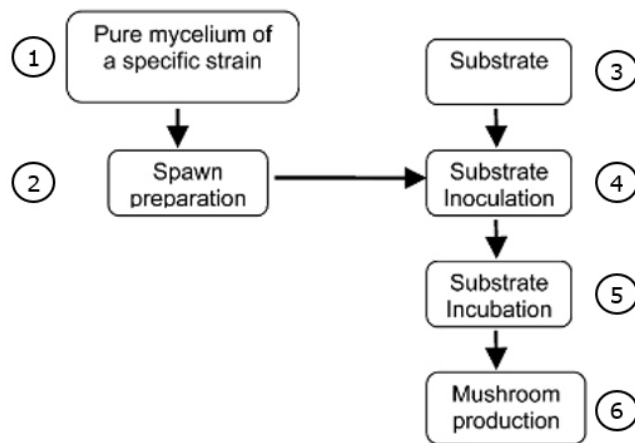
Jahtunud substraadile lisatakse seene mütseeliga teravili ning segatakse hoolikalt läbi. Substraadi kotte inkubeeritakse kultuurile sobilikel tingimustel, mis sõltub kasutatud substraadi segust ja seene liigist ning tüvest. Shiitake puhul kestab inkubatsioon kuni 3 kuud.

5. Substraadi inkubatsioon

Inkubatsiooni ajal levib seeneniidistik teraviljalt saepuru substraadile. Protsess toimub vähese valgustusega või täiesti pimedas ning soojas ruumis. Substraat on valmis viljumiseks, kui kogu substraat on seememütseeli poolt koloniseeritud.

6. Seente viljumine

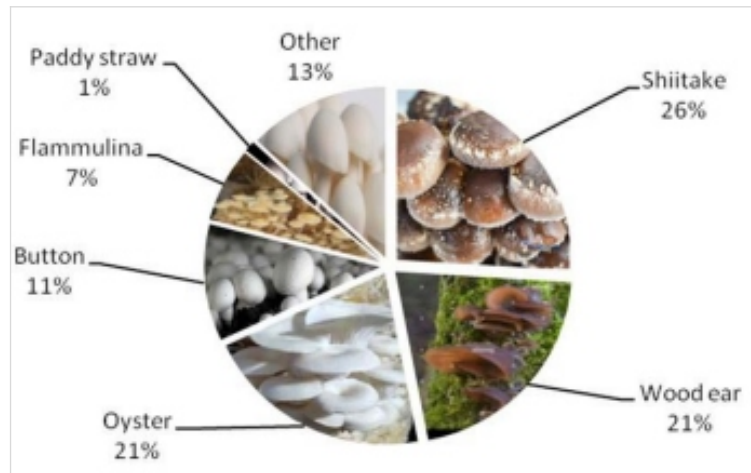
Shiitake substraadi puhul võetakse pealt kile ja viljutatakse reguleeritud niiskuse, õhuvahetuse, valgustsükli ja temperatuuriga kasvukambris. Kui seene viljakehad on piisavalt suured, need korjatakse ära ja pakendatakse.



Joonis 2. Seente tööstuse toimimise skeem (*spawn* - teramütseel), kus numbritega on esitatud protsessi etapid: 1. Mütseeli selekteerimine, 2. Teramütseeli valmistus, 3. Substraadi segamine ja autoklaavimine, 4. Substraadi nakatamine seenekultuuriga, 5. Substraadi inkubatsioon ja 6. Seente viljumine [4].

1.2.2 Kultiveeritavad seened

Euroopa ja USA seenetööstuses kasvatatakse kõige rohkem šampinjone, kuid Aasias kasvatatakse rohkem traditsioonilisi seeni. 2023 aasta andmete alusel moodustas seenetööstuse toodangust 26% shiitake, 21% austerservik, 21% „puukõrv“ (*Auricularia cornea*) seen, 11% šampinjoniid, 7% enoki (*Flammulina*), 1% *paddy straw* (*Volvariella volvacea*) ja 13% moodustasid muud seened (Joonis 3) [21].



Joonis 3. Globaalselt toodetud seente liigiline protsentuaalne osakaal [2].

Seente tarbimise populaarsust toetab ka fakt, et New York Times ajakirjas nimetati seeni 2022.aasta "*ingredient of the year*". Suurenenud tarbimisega on tekkinud ka uued trendid. Näiteks erinevate seenelisanditega jookide turg moodustas 2023. aastal 3.7 miljardit ning 2030.aastaks suureneb 6.7% [22]. Olulist tähelepanu on pälvinud ka seene snäkid. 2023.aastal moodustas shiitake kröpsude globaalne turu suurus 288.2 miljonit ning 2030.aastaks on oodata 6.4%-st tõusu [23].

1.3 Kultiveeritavad seened

1.3.1 Seente saepuru substraat ning lisandid

Kuna erinevad seeneliigid eelistavad erinevaid substraate, on õige substraadi valimine parimate tulemuste saavutamiseks oluline.

Substraadi materjaliks sobivad materjalid, mis on kõrge ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldusega. Seega, saab kasutada näiteks heina, põhku, saepuru, kookoskiudu ja kartongi. Substraadi toitainetega rikastamiseks võib lisada süsivesikute rikkaid lisandeid nagu erinevad kliidid: rukki-, kaera-, tatra- ja nisukliid aga ka soja jääke [24]. Antud töös oli kasutati rukki- ja nisukliidid, kuid vaatamata sellele võivad seened eelistada üht kliid teisele (Tabel 1). Substraadi niiskussisaldus peab jääma vahemikku 50 – 70% ja substraadi pH võiks jääda 5-6.5 vahele [24].

Tabel 1. Rukki-ja nisuklii toitumisalane teave 100g kohta

	Rukkiklii [25]	Nisuklii [26]
Energiasisaldus kJ/kcal	1168 kJ / 281 kcal	1171 kJ / 280 kcal
Rasvad	4.3	4.5
sh küllastunud rasvhapped	0.6	1.2
Süsivesikud kokku	65	66.8
sh suhkrud	3.0	2.7
Valgud	15	16.20
Kiudained	39	38

Seente kasvatases lisatakse substraadi segusse mineraalseid komponente, mis oleksid kaltsiumi rikkad. Kaltsium tagab seene rakuseina terviklikkuse ning reguleerib raku metaboolseid protsesse nagu ensüümide aktiivsus ja toitainete omastamine [27].

Kaltsium mõjutab positiivselt saepuru substraadi agregatsiooni, nt substraat kleepub vähem kokku ja on pudedam. Lisaks on leitud, et kaltsiumi lisamine substraadi koostisesse stimuleerib suurema koguse viljakehade moodustumist, millega suureneb ka tootlikus [27]

Kaltsiumi allikaks saab kasutada lubjakivi, munakestasid, meretähtede pulbrit ja austrite kestade pulbrit.

Seene elutegevuse käigus langeb substraadi pH, mida saab mõjutada kaltsiumkarbonaadi (CaCO_3) puhvrisarnaste omadustega. Kui pH langeb alla 5, siis inhibeerib happeline keskkond seeneniidistiku kasvu [28]. Zhang jt. leidsid oma uuringus, et 3% CaCO_3 või kanakoore lisamisel substraadi *laik-servikheiniku* (*Hypsizygus marmoreus*) seenekultuur kasvas tihedamalt [29]. Lisaks Choi jt leidsid, et 1% CaCO_3 lisamine substraadile ei mõjutanud negatiivselt seenekultuuri kasvu, kuid 4% puhul oli austerserviku seenekultuuri kasv oluliselt pärsitud [30].

Erinevalt teaduskirjandusest leidub palju õpetusi kipsi (CaSO_4) lisamisest substraadi koostisesse. Kips parandab substraadi omadusi tehes selle rohkem pudedamaks ning ei lase sellel kokku kleepuda, mis tagab parema substraadi segu aeratsiooni ja seeneniidistiku leviku. PH-d kips ei mõjuta [32]. Siiski Lee N.H seente kaltsiumi omastamise uuringust oli leitud, et CaSO_4 mõjub pärssivalt seene kasvule [33].

1.3.2 Seente kultuurid suures tööstuses

Seene meeldivus moodustub mitmetest faktorist: välimus, värskus, värvus, kuju, ühtsus, küpsus, tugevus, maitse, puhtus, mikroorganismide kooslus ja massikaost. Meeldivust mõjutab aga ka üldine seene kvaliteet, mis saab alguse valitud kultuurist, kasvutingimustest, korjest ja viljakehade säilitamisest [34].

Üks olulisim seente tööstuse komponent on kasutatavad kultuurid ning nende kõrge kvaliteet. Eelkõige nende võime kiiresti levida erinevates keskkondades nt substraadis ja moodustada viljakehi, mis omakorda vähendab inkubatsiooniaega ja suurendab tootlikust. Lisaks, tähtis parameeter on viljakehade ühtlane kvaliteet, mis vähendab kadusid pakkimisel [4].

Suurtööstused omavad oma kultuuripanka, kuid on ka võimalus väljaspoolt tellida kultuure, kas spooride või mütseeli kujul. Oluline on märkida, et sama spooride segust eraldatud isendid võivad drastiliselt erineda üksteisest oma morfoloogia, värvi, tootlikuse ja isegi toitainelise koostise poolest. Seetõttu on olemas eraldi ettevõtted, kes koguvad ja testivad erinevaid kultuure ning selekteerivad parimad tüved kultiveerimise jaoks [4, 34]

Sarnaselt loomakasvatusele on uute kultuuride arendamiseks, kasutatud DNA-põhiseid meetodeid nt CRISPR-tehnoloogiat. Eelkõige on oluline välja töötada kultuure, mis oleksid kõrge tootlikusega ja vastupidavad bakteriaalsete patogeenide ning seente haiguste vastu [4].

Kõik kultuurid, mis tellitakse läbivad mitmenädalase kontrolli, kontaminatsiooni või teiste probleemide (mütseeli hargnemine, värvus jne) tuvastamiseks. Kontrolli läbinud kultuurid saab hoiustada või kohe kasutusele võtta [4].

Kultuuride kõige efektiivsemaks hoiustamise viisiks on sügavkülmutamine, kuna kultuuril säilivad kõik kasvu parameetrid ja kultuur ei muutu vanaks. Kultuuride külmutamisel lisatakse hoiustamislahusesse krüoprotektante (glütserool, DMSO – dimetüülsulfoksiid). Protektandid imuvad läbi membraani rakkude tsütoplasmasse ja kaitsevad seda külmakahjustuste eest. Teiseks variandiks võib hoiustada kultuure kaldagaril, kuid sellega kaasneb rohkem tööd ja kultuuride hooldamist. Lisaks agaril hoiustatud kultuuri läbib pidevalt kasvu ja vananemise protsessi, mis mõjutab seenekultuuri kvaliteeti ning ei ole kõige sobilikum viis seente tööstuse jaoks [35].

1.3.3 Kultiveeritav lõvilakk-korallnarmik

Eelpooltoodud info alusel (Joonis 3), ei ole lõvilakk-korallnarmik (LV, *Hericium erinaceus*) kõige kultiveeritavam seen, kuid seoses globaalse seenetarbimise trendi tõusuga suureneb ka nõudlus LV järele. Eriti toetavad viimast avastatud seene funktsionaalsed omadused [36].

LV-lon valge ning ümar narmastega viljakeha, millel narmaste pikkus võib varieeruda (Joonis 4). LV viljakeha on pehme, käsnja ja kiulise tekstuuriga, mida on kerge lõigata või rebida. Kui seent ära praadida, on sellel mahe ja kergelt magus maitse, paljudele meenutab kana või krabi maitset. Seetõttu, kasutatakse LV-d liha asemel taimetoiduroogades. Looduses kasvab LV surnud puidu peal ning üldiselt on peetud seda harva looduses esinevaks seeneks [36]



Joonis 4. Shroomwell-i kasvukambris viljuv lövilakk-korallnarmik, mis on valmis korjamiseks.

LV on levinud Aasias, Euroopas ja Põhja-Ameerikas ning eelistatavalt jahedamates piirkondades. LV-l on pikk kasutus ajalugu Aasia kultuurides ja eriti Hiina traditsioonilise ´meditsiini praktikates. Traditsioonilises Hiina meditsiinis peeti seeni „üldiseks tervisetoonikuks“, mis toetasid kehas viite peamist organit: maks, põrn, kopsud, süda ja neerud. Budistlikes praktikates on LV seent väärtustatud kui vaimsete võimete toetajana [36].

1.3.4 Lövilakk korall narmiku funktsionaalsed omadused

Tänu LV seenes leiduvatele bioaktiivsetele komponentidele väärtustatakse seda antioksidatiivsete, vähivastaste, neurodegeneratiivseid protsesse leevendavate ja immuunsust ning seedeelundkonda toetavate funktsionaalsete omaduste tõttu [37].

Antioksidatiivsed omadused

LV koostises olevad polüsahhariidid on kõige rohkem uuritud ning on tõestatud, et LV koostises olevad polüsahhariidid on efektiivsed oksidatiivse stressi leevendamise puhul ehk nad suudavad neutraliseerida organismis leiduvaid vabu radikaale, vähendada reaktiivse hapniku (ROS) tekkimist ning reguleerida antioksidatiivsete ensüümide aktiivsust nagu superoksiid dismutaas ja katalaas [37, 38].

Vähivastased omadused

LV koostises olev isoindoolide hulka kuuluv - heritseriin (*hericerin*) omab vähivastastaseid omadusi. Viljakehadest tehtud alkoholi tõmmised pärssivad müeloidsete (vereloomekoe) kasvaja rakkude arengut [39]. Lisaks leiti, et hertseriin aktiveerib apoptoosi rajad soole-ja maovähi rakkudes. Lisaks näidati, et LV -st eraldatud lipiidid omasid pärssivat mõju maksavähi rakkudele [38].

Neurodegeneratiivsed omadused

In vitro uuringute alusel LV-st saadud ekstraktid stimuleerivad uute närvirakkude teket ning nende differentseerumist. Lisaks *in vitro* katsetes selgus, et ekstrakti mõjul oli stimuleeritud neuronite parem kaetavus müeliini kihil poolt [40]. Wong jt. leidsid, et LV ekstrakt mõjus efektiivselt hiirte

pindluu närvivigastuse taastumisele ja hiirte tagajalgade aktiivsus oli palju parem kui kontroll grupil [41].

Seedeelundkonda toetavad omadused

LV viljakehadest eraldatud polüsahhariidide segud manustati vanematele hiirtele 28 päeva jooksul. Fekaalide 16S sekveneerimisest selgus, et *Lachnospiraceae* ja *Akkermansiaceae* bakterite kooslus suurenes, samal ajal kui *Rikenellaceae* ja *Bacteroidaceae* bakterite kooslus mikrobiotas vähenes. Lisaks oli täheldatud signaalmolekulide suurenenud aktiivsust, läbi fosforüülimis protsessi, mis omakorda võib omada positiivset mõju immuunsusele [38].

Sarnast mõju oli leitud Yang jt. uuringus, kus LV-st eraldatud lipiidid omasid immunomoduleerivaid omadusi. Eelkõige LV lipiidid mõjutasid mikrobiota koostist ja ainevahetust ning T-rakkude tootmist, millest järeldati ka prebiootilisi omadusi [39].

2 TÖÖ EESMÄRGID

Teaduskirjanduse alusel on LV seenekultuuride kasvuparameetreid juba uuritud, kuid antud kontekstis on töö tugevalt seotud Shroomwell Innovation OÜ tegevustega. Ettevõttel on seente kasvatuse tööstus, mille süsteemid vajavad täiendamist, eriti puudutab see laboris tehtavat seenekultuuridega tööd.

Lähtudes eelnimetatust püstitati käesoleva magistritöö eesmärkideks uurida Shroomwell Innovation OÜ ettevõtte kultuuripangas olevate (LV) tüvede kasvuparameetreid kolmes erinevas tööstuslikus etapis: MEA söötmel, teramütseelil, substraadil ning hinnata kultuuride sobivust seente tööstuslikuks kasvatamiseks.

Uurimistöö eesmärgid:

- Määrata LV seenetüvede kasvu MEA tardsöötmel ja kirjeldada kultuuride väliseid erinevusi.
- Määrata LV seenetüvede kasvu hirsist teramütseelil.
- Määrata LV seenetüvede kasvu kuuel erineval saepuru substraadil.
- Eelnimetatud kolmes keskkonnas (MEA, hirss, substraat) LV kasvuparameetrite alusel määrata, millised seenetüved on kõige sobilikumad tööstuslikuks kasutamiseks.

3. EKSPERIMENTAALNE OSA

3.1 Materjalid ja meetodid

3.1.1 Materjalid

Kõik LV kultuuridega seotud katsed teostati Shroomwell Innovation OÜ Tallinna laboris ja niiskussisalduse ning pH analüüsid teostati Tallinna Tehnikaülikooli Keemia ja biotehnoloogia instituudi toidutehnoloogia toidulaboris.

Tabel 2 kaardistab eksperimentaalses osas kasutatud LV kultuure, nende lad.k. nimetust, riiki, kust nad on tellitud ja tellimise aastat. Ettevõtte nimed on konfidentsiaalsuse alusel määratletud ainult attevõtte päritolu riigiga.

Tabel 2. LV kultuuride põhiline informatsioon

Tähis	Liigi nimi lad.k.	Päritolu	Tellitud
LV1	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2022
LV2	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2022
LV3	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2023
LV4	<i>Hericium erinaceum</i>	Belgia	2023
LV5	<i>Hericium erinaceum</i>	Belgia	2023
LV6	<i>Hericium erinaceum</i>	Poola	2024
LV7	<i>Hericium erinaceum</i>	Poola	2024
LV8	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2024
LV9	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2024
LV10	<i>Hericium erinaceum</i>	USA	2024

Kasutatud materjalid

Kuivatatud linnaseekstrakt (Biolife), agar tardsöötmetele „Bios Special LL“ (Biolife), destilleeritud vesi tardsöötmele (Falleroon), teravilja värvimiseks söetabletid (UNA), must toiduvärv (geel) (MELNA), must toiduvärv (pulber) (Sosa Ingredients), teravilja ja substraadi jaoks filterkotid (SacO2), lehtpuu saepuru (Värska Laht OÜ), substraadi lisandid kustutatud lubi (kaltsiumkarbonaat CaCO₃) 98% (LEROCHEM), kips (kaltsiumsulfaat, CaSO₄) 99.9% (LEROCHEM), nisuklii (Taru Mill AS), rukkiklii (Tartu Mill AS), teramütseeli valmistamiseks hirss (Tartu Mill AS) ja pH indikaatorpaber (PL Percision Laboratories).

Kasutatud seadmed

Kaalud (Romasas, CE M) max 25kg, Kaalud max (RADWAG, PS100.R2) max 1kg, täppiskaalud (ADAM, HCB123) max 120g, autoklaav (BIOBASE, BKQ-B75V), filterkottide sulgemiseks impulsskuumutihendaja (Mercier Corporation, MC-1200HS), inkubaator (BIOBASE, BJPX-H160BK(G)), seenekultuuride vaatluseks trinokulaar stereomikroskoop (AmScope, SM-3TPX-FRL-P), mikroskoobikaamera (Aptina MT9V011), laminaarkapp (BIOBASE, BBS-H1500), pH-meeter (METTLER TOLEDO, S20 SevenEasy), halogeen niiskusanalüsaator (METTLER TOLEDO, HR83 Halogen GWB), veeaktiivsuse mõõtja (AquaLab CX3)

3.1.2 LV seenekultuuride käsitlemise protsessid

Iga seenetööstuses olevad seenekultuuride käsitlemise protsessid võivad erineda. Allpool on toodud Shroomwell Innovation OÜ-s osa rakendatavatest protsessidest.

Kontroll

Kõik väljas poolt tellitud kultuurid läbivad puhtuse kontrolli. Kultuurid külvatakse antibiootikumideta (90mm) MEA söötmetel ning lastakse seeneniidistikul levida mööda söötme pinda. Esimesest külvist teostatakse lisaks teine külv ja sellest omakorda veel kolmas külv [42].

Kultuuride säilitamine

Puhtuse kontrolli läbinud kultuurid säilitatakse -80°C kultuuri pangas. Aseptilisi võtteid järgides, lõigatakse seeneniidistiku piirjoonelt (kasvanud tardsöötme) väikesed ruudud ning pannakse krüoviaalidesse. Eluskultuuride kaitseks lisatakse viaalidesse steriilset 10%-st glütserooli lahust, mis käitub protektandina veekristallide eest [43].

MEA tardsöötme valmistamine ja LV kasvu määramine

1L deioniseeritud vees lahustatakse alguses 20g/L linnaseekstrakti ja hiljem segu kuumutamisel lisatakse 20g/L agarit. Sööde valatakse 250 ml kolbidesse ning autoklaavatakse 121°C juures 15 min. Peale autoklaavimist lastakse söötmele jahtuda 35°C-40°C-ni ja valatakse laminaarkapi all petri tassidele. Tardunud söötmed nakatakse seenekultuuriga ja inkubeeritakse. Kultuuride levimisel mõõdetakse, kui kaugele kasvab seeneniidistik ning mis on seenetüvede visuaalsed erinevused kolme nädala jooksul [44]. Täpsem protsessi kirjeldus on välja toodud lisas (Lisa 4).

Hirsist teramütseeli valmistamine ja LV kasvu määramine

Hirss leotatakse üleöö, pestakse läbi ning kuumutatakse 10 min. Teravili kurnatakse ja jäetakse jahtuma. Jahtunud hirss värvitakse vastavalt juhendile 2g/kg toiduvärvi ja samas kontsentratsiooniga purustatud söetablettidega. Värvitud hirss pannakse filterkottidesse ning autoklaavatakse 121°C juures 2.5 tundi. Hirsiga filterkotid ei jää jahtumise ajaks autoklaavi sisse. Autoklaavitatud teraviljaga kotid võetakse laminaarkapi alla ja kasutades steriilset lusikat pannakse sisu ühtlase kihina petri tassile. Petri tassil olev teravili nakatakse keskosast seene kultuuriga ja inkubeeritakse 22.5°C juures kolm nädalat. Inkubeerimise ajal toimub seene kultuuride monitoorimine, kui kaugele seenemütseel levib. Täpsem protsessi kirjeldus on välja toodud lisas (Lisa 4).

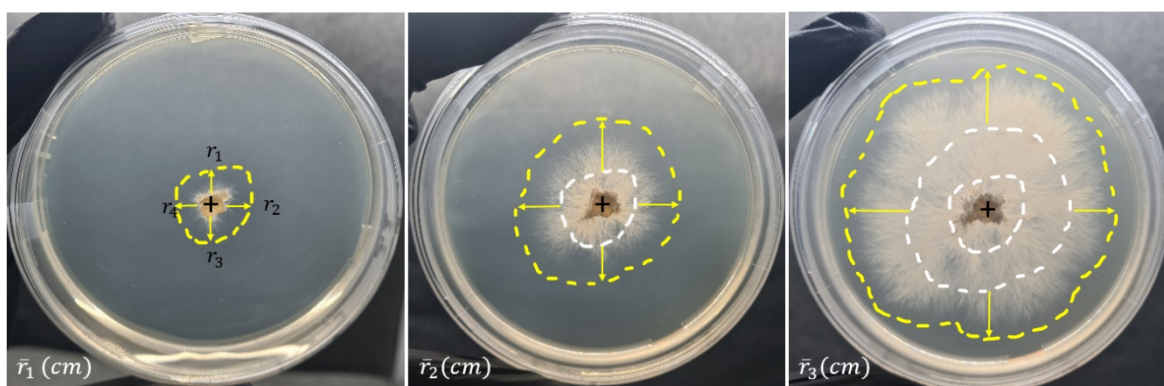
Sobiliku substraadi valimine ja LV kasvu määramine

Lehtpuu saepuru, kliid ning mineraalsed lisandid segatakse vastavalt kuivkaalule kokku ning lisatakse samapalju vett. Lastakse substraadi segul seista 2 h. Kui halogeenanalüsaatoriga mõõdetud substraadi niiskussisaldus jääb alla 60%, lisatakse juurde vett (1L kaupa). Oluline on, et niiskussisaldus oleks 60-70% vahel. Substraadi segu pakitakse 1kg kaupa filterkottidesse, autoklaavitakse 121°C juures 3 tundi ning jäetakse üleöö autoklaavi jahtuma. Jahtunud substraadid võetakse sarnaselt teramütseelile laminaarkapi alla ja steriilse lusikaga pannakse substraat ühtlase kihina petri tassile. Petri tassil olev substraadi materjal nakatatakse keskosast seenekultuuriga ja inkubeeritakse 22,5°C juures. Seeneniidistiku levikuga, määratakse enim sobilik substraat [45]. Täpsem protsessi kirjeldus on välja toodud lisas (Lisa 4).

3.1.3 LV seenekultuuride kasvu määramine

Petri tassis oleva söötme (hirsi või saepuru substraadi) keskpunkti nakatatakse LV seenekultuuriga. Kultuuri kasvu määramiseks tõmmatakse petri tassi kaanele 4 raadiust, kus keskpunktiks on inokulum [44]. Kuna inokulum on teisest MEA sööttest seene kultuuriga tükk, siis tüki suurst ei arvestata raadiuse arvutamisel. Raadiust mõõdetakse inokulumi äärest.

Sõltudes seene kultuurist, valitakse ajavahemik tunnid kuni nädalad, mille tagant teostatakse mõõtmised. Kultuuride kasvu mõõtmisel kasutatakse tavalist joonlauda. Kasvukiiruse (R_2) arvutamisel määratakse 4 raadiust, võetakse keskmine ning jagatakse nädalate arvuga (Joonis 5) arvutusvalemid 1 ja 2 on esitatud allpool.



Joonis 5. LV kultuuri kasvuraadiuste - r_1 , r_2 , r_3 , r_4 määramine MEA söötmel kolme nädala jooksul. Kollasega on piiritletud mütseeli leviku piirjoon ning valgega eelmise nädala kasvu piirjoon. Keskpunktis on ristiga märgitud inokulum, mida raadiuste mõõtmisel ei arvestatud.

$$\bar{r} = \frac{(r_1 + r_2 + r_3 + r_4)}{4} (1),$$

$$R_{nädalas} = \frac{\bar{r}}{t} (2),$$

$r_1; r_2; r_3; r_4$ – ühe petritassi neli raadiust (cm)

\bar{r} – nelja raadiuse keskmine (cm)

$R_{nädalas}$ – keskmine kultuuri kasvu raadius nädalas ehk kasvukiirus (cm/nädalas)

t – nädalate arv

3.1.4 pH mõõtmised

MEA söötme pH oli mõõdetud PL Percision Laboratories pH indikaatorpaberiga, kui autoklaavitud sööde oli jahtunud 30-35°C kraadini [46].

Hirsi pH mõõtmisel lisati 50 ml keeduklaasi 1g uhmriga peenestatud hirssi ning 10 ml deioniseeritud vett, segati mitu korda ning mõõdeti klaaselektrood pH-meetriga [47].

Saepuru substraadi pH puhul lisati 100ml keeduklaasi 2g saepuru ning lisati 40 ml deioniseeritud vett, segati mitukorda ning pH tulemused mõõdeti pH-meetriga 24 tunni pärast [48].

4 Tulemused ja arutelu

4.1 LV kultuuride kasvuparameetrite määramine

LV seenekultuuride kasvuparameetreid ja ka visuaalseid erinevusi hinnati kolmes kasvukeskkonnas: MEA tardsöötmele, hirsil ja erinevatel saepuru substraatidel. Antud töö esialgse plaani järgi oli planeeritud teostada ka tööstusliku tootmise skaalas katse, et hinnata LV kultuuride tootlikust. Kuid ajapiiratuse ning tööstuse rangete tööplaanide tõttu, jääb tuleviku plaanidesse.

4.1.1 Kasvuparameetrid MEA tardsöötmele

Kultuuride puhtuse kontroll

Kõik -80C kultuuripangas hoiustatud LV seenekultuurid olid läbinud 3-astmelise külvamise kontrolli. Protokollis märkuste alusel 2022 ja 2023 aastal lisatud kultuuridel polnud mikrobioloogilist kontaminatsiooni märgatud. Sama puudutab ka 2024 aastal lisatud uusi kultuure. Lisaks võib välja tuua, et kultuuri panga haldamine oli teostatud mitme inimese poolt ning mõned antud töös kasutatavatest kultuuridest olid lisatud kultuuripanka teiste Shroomwell ettevõtte laboritöötajate poolt.

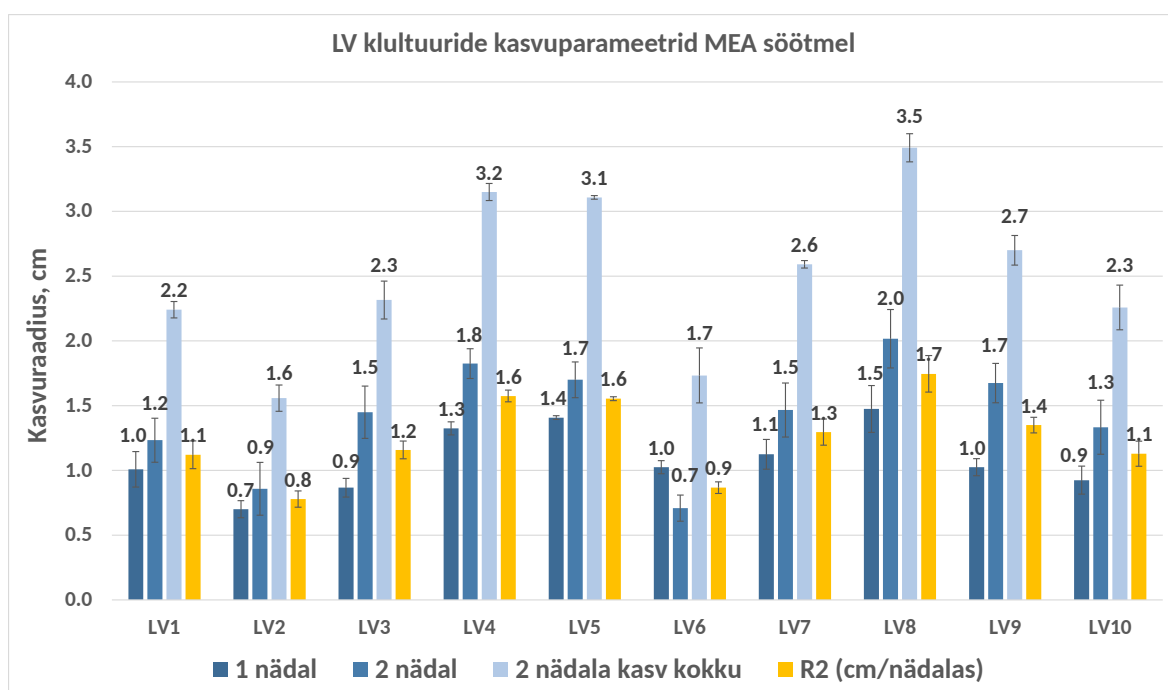
LV kultuuride väljakülvid

Töös uuriti MEA tardsöötmetel kümne erineva LV kultuuri kasvuparameetreid, mis kõik olid eelnevalt hoiustatud -80°C kultuuripangas. Kultuuride külmutatud olekus säilitamise periood varieerus kahest aastast kuni ühe kuuni, peale ülessulutamist ja külvamist olid kõik kultuurid elujõulised.

Kasvuparameetrite määramiseks olid LV kultuurid külvatud MEA tardsöötmele, mille pH oli 6,5. Kuna LV kultuurid on saprotroofsete seente seas aeglase kasvukiirusega, otsustati, et kultuuri raadiuse mõõtmised teostatakse iga päeva asemel üks kord nädalas. Vaatamata kultuuride aeglasemale kasvule, oleks sobinud määrata kultuuride raadiust pigem iga viie päeva tagant, kuna planeeritud kolme nädala tulemuste asemel, sai arvestada ainult kahe nädala tulemustega (Lisa 2) (Joonis 6, Tabel 3). Põhjus seisneb kiires kultuuride kasvus ja teise nädala lõpus olid mõned mütseelid puutunud petri tassi seinu (2 ja 3 nädala vahel). Seega, me ei saa öelda, kuidas seenekultuur oleks edasi ilma petri tassi ääri kasvanud.

Tabel 3. Seenekultuuride LV1-10 kasvuraadiused MEA tardsöötmel.

Kasvuraadius	LM1	LM2	LM3	LM4	LM5	LM6	LM7	LM8	LM9	LM10
1 nädal (cm)	1.0	0.7	0.9	1.3	1.4	1.0	1.1	1.5	1.0	0.9
STDEV	0.138	0.066	0.072	0.050	0.014	0.050	0.115	0.180	0.066	0.109
2 nädal (cm)	2.2	1.6	2.3	3.2	3.1	1.7	2.6	3.5	2.7	2.3
STDEV	0.170	0.204	0.202	0.115	0.138	0.101	0.208	0.225	0.152	0.208
3 nädal (cm)	4.2	2.5	4.2	4.2	4.2	2.5	4.2	4.3	4.2	4.1
STDEV	0.063	0.101	0.146	0.066	0.014	0.213	0.029	0.109	0.115	0.173
2 nädala kasv kokku (cm)	2.2	1.6	2.3	3.2	3.1	1.7	2.6	3.5	2.7	2.3
R2 (cm/nädalas)	1.1	0.8	1.2	1.6	1.6	0.9	1.3	1.7	1.4	1.1
STDEV	0.107	0.063	0.068	0.046	0.014	0.045	0.100	0.141	0.061	0.097



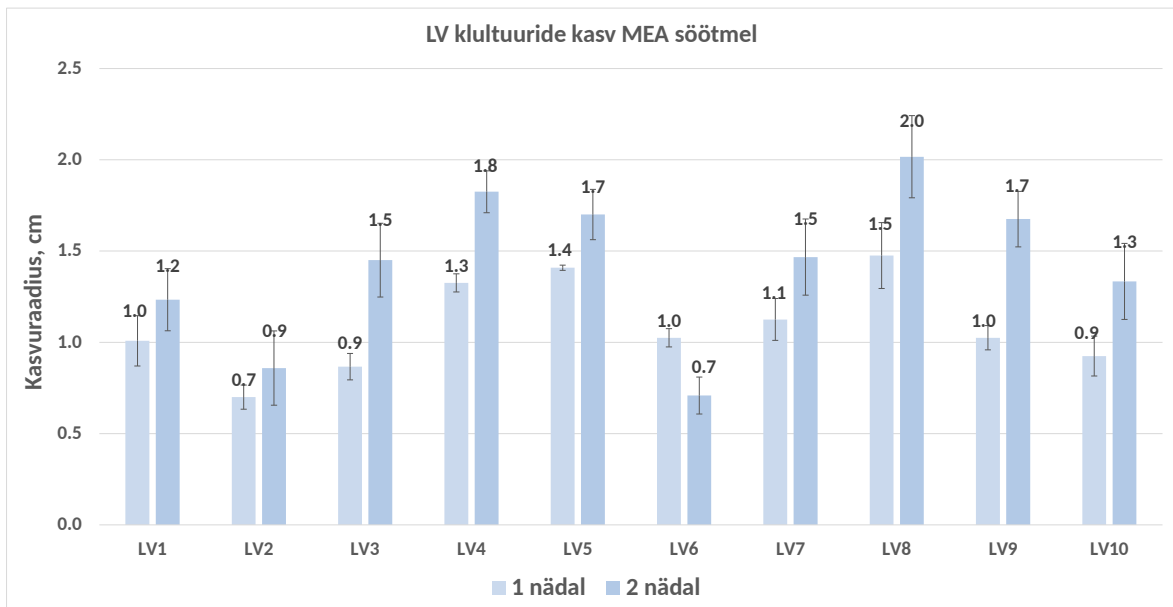
Joonis 6. Seenekultuuride LV1-10 kasvuparameetrid MEA tardsöötmel. Esitatud on eraldi kasv kahe nädalal ning helesinisega summaarne kasv . R2 – keskmine kasvukiirus nädalas, tulpade kohal on numbriliselt esitatud vastav keskmine väärtus, indikaator tähistab standardhälvet, n = 3

Kasvuraadiuse alusel kõige kiirema seeneniidistiku levikuga olid LV8, LV5 ja LV4. Nende kultuuride kahe nädala keskmine kasvukiirus R2 oli LV8 = 1.7 cm/nädalas, LV5= 1.6 cm/nädalas ja LV4=1.6 cm/nädalas. R2 kasvukiirus on hästi kooskõlas ka kahe nädala kultuuride kogu kasvuga ning need tüved levisid ka kõige kaugemale, vastavalt LV8=3.5 cm, LV5=3.1 cm ja LV4=3.2 cm. Mõlema R2 ja 2 nädala kasv kokku parameetri alusel levis kümne seenekultuuri seast kõige paremini LV8 ehk 2 nädala kasv kokku oli 3.5 cm ja mütseeli kasvukiirus R2 oli 1.7cm/nädalas.

Kõige aeglasema kasvuga olid LV2 ja LV6 seenekultuurid, kus R2 väärtused olid vastavalt 0.8 cm/nädalas ja 0.9 cm/nädalas. Võrreldes LV8 kultuuriga on LV2 ja LV6 kasv 0.8cm/nädalas võrra väiksem. Seega, LV2 ja LV6 seenekultuurid ei sobi selle parameetri põhjal tööstuslikeks katseteks. Keskmiste kasvuparameetritega kultuurid: LV1, LV3, LV7, LV9, LV10, ka ei sobi tööstuslikeks

katseks. LV9 kultuuri r2 tulemused jäävad küll alla LV8, LV5 ja LV4 tulemustele, kuid on nendele piisavalt lähedal, et vajadusel võib ka seda tüve tööstuslikult katsetada.

Võttes arvesse kultuuride vanust, siis seal suurt erinevust ei leitud. 2022 aasta kultuurid LV1 ja LV2 võisid olla juba algusest nõrgemad kultuurid, kuna nende päritolu nin transerite ajalugu polnud hästi dokumenteeritud. Kuna antud tüved olid ostaetud USA populaarsest hobikasvatajate interneti platvormilt, siis juba algselt need kultuurid võisid pärineda vanemast kultuurist. olla vanad. Lisaks infot kultuuri hoiustamise või värskuse osas pole. Seega, tegu võis olla juba enne sügavkülmutust vanema kultuuriga. 2023 aasta kultuurid LV3 - LV5 ja eriti kaks viimast olid kiirema levikuga kultuurid, kui 2022 kultuurid. 2023 aastal alustati Shroomwell ettevõttes seenetööstuse arendustöödega, seega ka sisseostetavad kultuurid olid sihikindlamalt valitud. 2024 aasta kultuurid LV6 - LV10 olid kõik tööstuslikuks kasvatamiseks ostetud kultuurid, kuid vaatamata sellele kultuuride kasvukiiruste (R2) parameetri puhul on suur erinevus LV6 =1.7 cm/nädalas ja LV8=3.5 cm/nädalas. Võib järeldada, et vähemalt antud katsete käigus kultuuride sügavkülmutamise aeg ei mõjuta oluliselt seeneniidistiku levikut ning kasvukiirus on iga seenekultuuri individuaalne erisus (Joonis 7, Joonis 8).

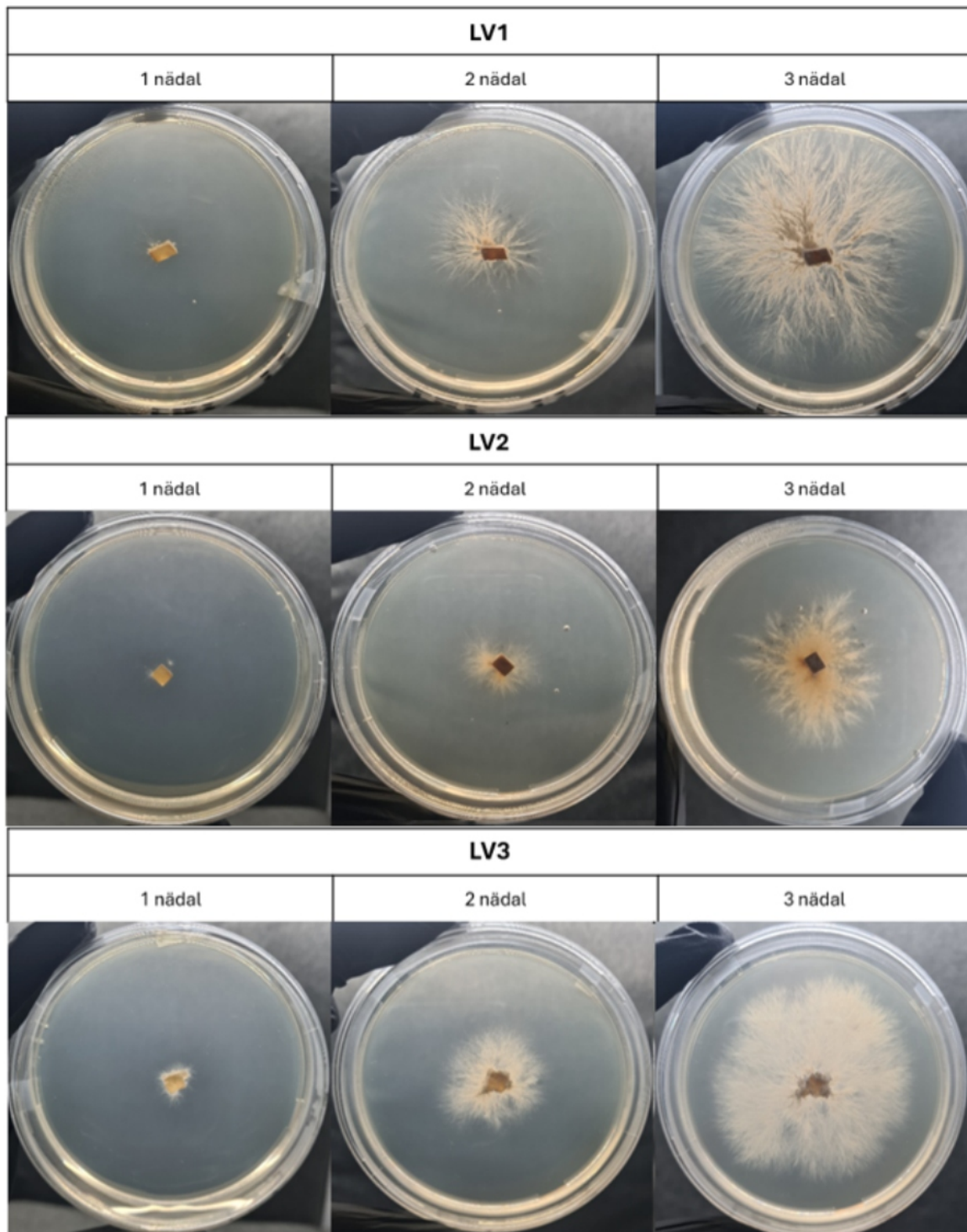


Joonis 7. Seenekultuuride LV1-10 keskmised kasvuraadiused esimesel ja teisel nädalal, indikaator tähistab standardhälvet, n=3

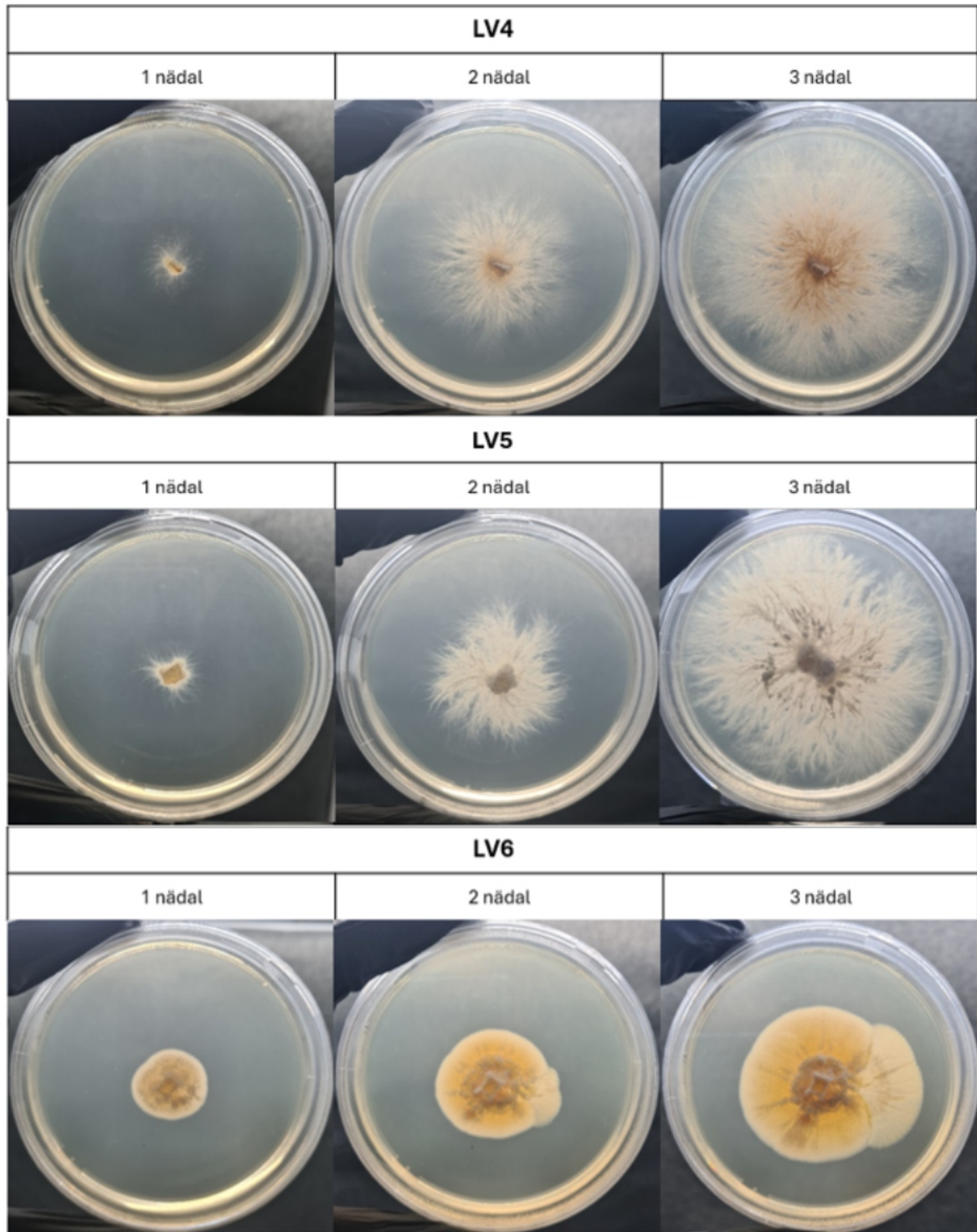
Kultuurid LV1 ja LV2 olid tellitud kõige esimesena, seega kvaliteet kasvukiiruse näol on keskmine, kõige madalama levikuga on kultuuride LV2 ja LV6. 2023. ja 2024. aastal tellitud kultuuride erinevad kasvuraadiused on igal kultuuril individuaalsed. Kui võrrelda Liu et al. 2024 teadustööga, siis MEA söötmel LV kultuuride kasvukiirused varieerusid 2.10 kuni 4.31 mm/päevas, mis oleks 1.47 kuni 3 cm/nädalas [49]. Meie kultuuride kasvuraadiused jäid antud teadustöö raamidesse.

Lisaks kui võrrelda LV kasvu shiitake seenega (L. edodes), siis Shanmugaraj et al. 2024 teadutöö alusel MEA söötmel shiitake mütseeli kasv 6 päeva peale nakatamist moodustas 3.29 cm (3.8 cm/nädalas) [50]. Seega, shiitake seenetüved kasvavad kiiremini, kui LV seenetüved.

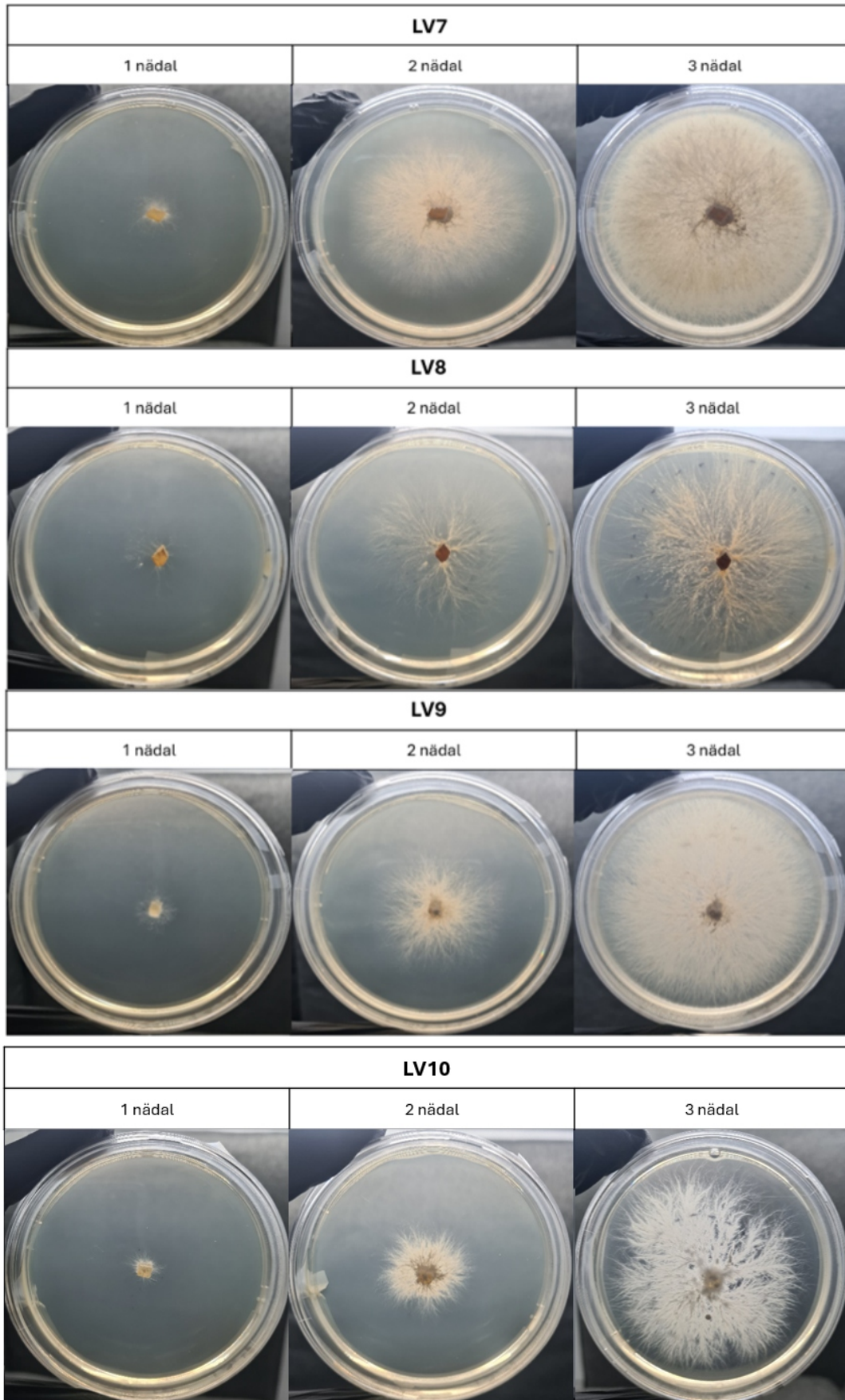
LV1-10 kultuuride morfoloogia



Joonis 8. Seenekultuuride LV1-10 kasv MEA tardsöötmel. Kultuurid olid pildistatud 7 päeva tagant, kolm nädalat järjest.



Jätk. Joonis 8. Seenekultuuride LV1-10 kasv MEA tardsöötmel. Kultuurid olid pildistatud 7 päeva tagant, kolm nädalat järjest.



Jätk. Joonis 8. Seenekultuuride LV1-10 kasv MEA tardsöötmel. Kultuurid olid pildistatud 7 päeva tagant kolm nädalat järjest.

Töös kasutatatud seenekultuuride kolme nädala kasvud on välja toodud joonisel 8. Väliste tunnuste poolest kõik kultuurid peale LV6 vastasid teaduskirjanduses *Hericium* mütseeli kirjeldusele(49).

Esimesel nädalal peale söötme nakatamist tekkis õhuke peaaegu läbipaistev mütseel, mis ühtlase kihi asemel kasvas laiali harudena. Kultuuridel LV3, LV5, LV7, LV9 ja LV10 oli mütseel tihedam ning seda oli märgata valge kumana inokuleerimise punkti ümbruses.

Teisel nädalal kultuuride erinevused olid veel paremini näha. LV kultuurile omased üksikud hargnevused olid paremini nähtavad ning läbipaistev mütseel oli muutunud paksemaks ja heledamaks. LV1, LV2 ja LV8 mütseel oli hästi levinud, kuid säilitas oma peensuse ja läbipaistvuse. Seevastu kultuurid LV3, LV5, LV7, LV9 ja LV10 olid ka hästi levinud ning moodustus tihedam ja vähem hargnev mütseel.

Kolmanda nädala lõpuks olid LV1, LV4, LV5, LV7, LV8, LV9 ja LV10 kultuuride mütseel levinud petri tassi . LV1 oli välja kasvanud ebaühtlaste harudena ja seeneniidistik jäi küllaltki õhukeseks. LV2 oli kolmandaks nädalaks kõige aeglasema kasvuga. Lisaks seeneniidistik tundus väsinud, harunes ebaühtlaselt ning kultuuri värvus oli tuhm valge. LV3 moodustas tiheda ning ühtlaselt ringis kasvava terve seeneniidistiku. LV4 moodustas tiheda valge niidistiku ning inokuleerimise punkti juures oli seeneniidistik paksem ja kergelt tumedam. LV5 kasvas võrreldes LV4-ga kiulisemalt ning niidistik tundub valgem ja tervem. LV7 moodustas kolmandal nädalal ülitiheda ja isegi kergelt koheva niidistiku. Kohevus ei ole väga iseloomulik LV kultuuridele, kuid kerge kohevus on vastuvõetav, kuna näitab, et tegu on elujõulise seenekultuuriga. LV8 sarnanes LV1 kultuurile, on näha hõredalt seeneniidistiku kiudusid ning seeneniidistik ei ole tihe. LV9 sarnanes seeneniidistiku tiheduse poolest LV7 kultuurile. LV10 oli veel seenekiudude hargemistega kui LV5, niidistik oli erk valge ning terve välimusega.

Liu M. et al. 2024 teadustöö alusel täheldati, et loodusest kogutud LV kultuuride mütseel MEA söötmel on ebaühtlase kasvuga ning kasvavab harudena. Samal ajal, kui aretatavad tööstuslikuks kasvatamiseks kultuurid omavad ühtlast ringis kasvavat mustrit ning kasvavad tihedama ja ilma nähtavate harudeta mütseeli kihina [49]. Sellest lähtudes võib järeldada, et loodusest on kogutud LV1, LV2, LV8 ja LV10 kultuurid, ning aretatud seenetüved on LV3, LV7 ja LV9. Kultuuride LV4 ja LV5 ei ole selge.

Kümnest LV kultuurist erines kõige rohkem LV6 kultuur. Esimese nädala lõpuks omas LV6 mütseel valget, kuid liiga tihedat ja ühtlases ringis kasvavat seeneniidistikut (Joonis 8, LV6). Teise nädala lõpus tekkis mütseelil kollakas alatoon ning oli märgata veel teise kultuuri olemasolu. Sellest tulenevalt saadeti LV6 kultuur geneetilisele sekveneerimisele, mille tulemused on esitatud allpool. Kolmanda nädala lõpus oli hästi näha, et tegu on teise seenekultuuriga kontamineerunud prooviga. Kontaminatsiooni tõttu pole sellisel kujul antud kultuuri võimalik kasutada tööstuslikult. Vajadusel saab isoleerida puhaskultuurid.

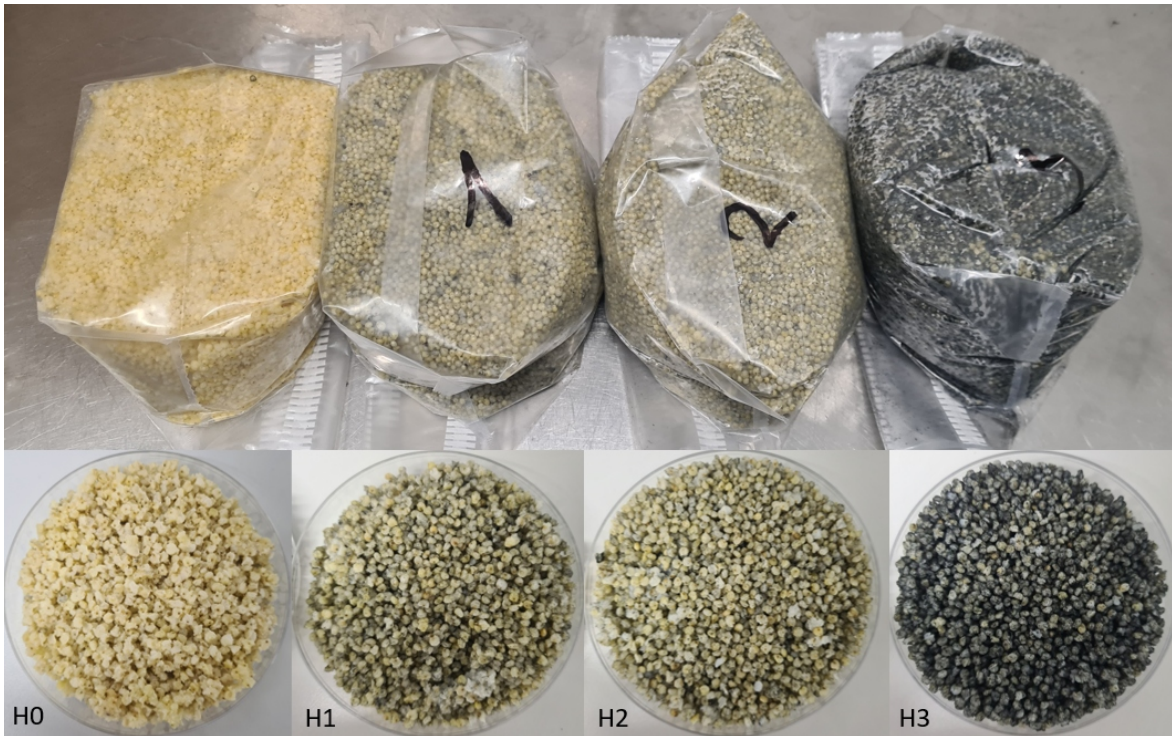
Tartu Ülikooliseostati PCR analüüs seente spetsiifiliste praimeritega. Tulemust võrreldi INSDC andmebaasiga, mille alusel kollane seenekultuur on 99,6% sarnane *Aspergillus tubingensis* seenekultuuriga. UNITE andmebaasi alusel sarnanes see 93.05% *Aspergillus* sp. liigiga. Valge

väljakasvav kultuur oli INSDC andmebaasi alusel 97,6% sarnane *Hericium erinaceus* seenekultuuriga ning UNITE alusel 92,4% sarnane *Hericium sp.* liigile. Sega kultuuri korral hakkavad mõlemad liigid üksteise kasvu takistama. Antud näitel *Aspergillus* oli domineerivam, kuid *Hericium* oli võimeline välja kasvama. Lisaks võib oletada, et *Hericium* (LV6) kultuur on oli nõrgem, seega ka kasv oli takistatud. Kokkuvõttes, LV kultuuri on vaja läbi mitme ülekande puhastada. Puhastatud LV6 kasvu tuleb analüüsida teistega samadel tingimustel, et selguks kas tööstuses saaks kultuuri kasutada või ei saa. Edasisest substraatide katses oli LV6 välja võetud. Võimalik, et kultuuri ettevalmistus sügavkülma hoiustamiseks ei olnud teostatud piisavalt aseptiliselt.

Seeneliik *Aspergillus tubingensis* osaleb toiduainete ja eriti puuviljade ning heina riknemisel. Kultuuri mütseel on tihti tume hall, kuid külvatuna MEA söötmele võib esineda ka kollastes toonides [51].

4.1.2 Kasvuparameetrid hirsist teramütseelil

Rukkiterade asemel eelistatakse Shroomwell ettevõttes kasutada teramütseeli saamiseks hirssi. Ettevõtte siseselt on tõestatud, et sellel on madalam kontaminatsiooni tõenäosus. Kuna rukkiteradel on teravilja kest, mille all võivad olla mikroorganismid kaitstud steriliseerimise eest, isegi pikema autoklaavimise tsükli puhul võib sellel esineda kontaminatsiooni. Hirsiteradel aga kest puudub, mis teeb steriliseerimise palju efektiivsemaks. Lisaks substraatide nakatamisel on hirsiteri sama mahuühiku kohta rohkem kui rukkiteri, seega substraadil on rohkem inokuleerimise punkte, millest levib edasi mütseel ning toimub kiirem substraadi läbikasvamine seeneniidistiku poolt. Antud uurimistöös oli esmakordselt katsetatud terade värvimist, et määrata kultuuride kasvukiirused teraviljal. Värvimiseks kasutati söetablette (UNA), toiduvärvist musta geeli (MELNA) ja musta pulbrit (Sosa Ingredients), kõiki lisati 2g/kg kohta. Värvimine oli vajalik selleks, et määrata paremini kui kaugele oli seeneniidistik levinud. Hirsi värvimist teostati kahes etapis. Alguses prooviti hirsiterasid leotada üleöö värviga vees, kuid värv ei jäänud hirsile külge. Viimaks segati juba eelnevalt leotatud hirsile purustatud söetabletid või kaks toiduvärvi ning autoklaaviti (Joonis 9). Viimasega jäi toiduvärv hirsile hästi külge.



Joonis 9. Hirsi katses on esindatud: H0 – tavaline hirss, H1-söetablettidega (UNA) värvitud hirss, H2 – musta toiduvärvist geeliga (MELNA) värvitud hirss ja H3 – musta pulbrist toiduvärviga (Sosa Ingredients) värvitud hirss. Üleval on hirsiga autoklaavitud filterkotid ning all petri tassidel hirss. H0 – on kontroll.

Kõikide parameetrite kaardistamiseks mõõdeti H0, H1, H2 ja H3 hirsside pH-d, niiskusesisaldust ja veeaktiivsust (a_w) (Tabel 4). Tavalise hirsi H0 pH oli enne, kui ka peale autoklaavimist pH=6.5. Enne autoklaavimist oli H1-H3 pH natuke kõrgem pH=6.6 ning peale autoklaavimist langes see natuke pH=6.4. Niiskussisaldus varieerus 41-43.4% vahel, mis on vastuvõetav, kuna teramütseeli valmistamisel optimaalne niiskussisaldus on 30-40% [52]. Kuna toiduvärvidest toimis kõige paremini pulbrist toidu värv (Sosa Ingredients), siis seda kasutati edasises katses. Veeaktiivsus kõikidel hirsi proovidel oli $a_w=1$, mis näitab, et hirsis on piisvalt niiskust mikroorganismide kasvuks.

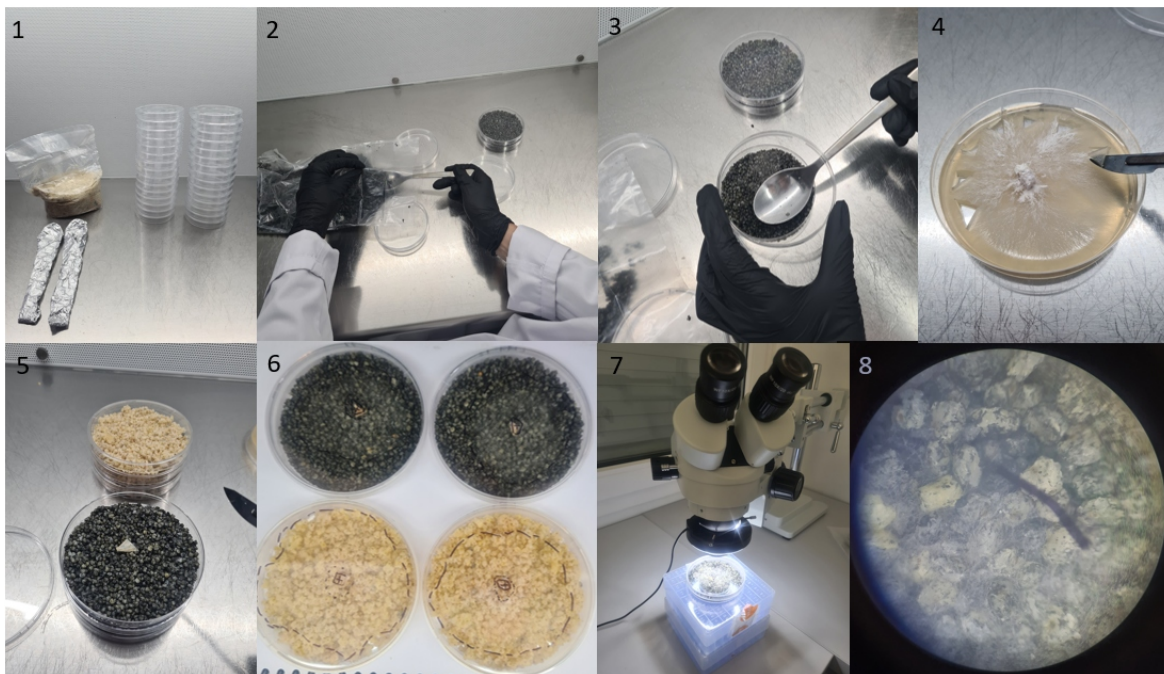
Tabel 4. Hirsiterade pH, niiskussisaldus ja veeaktiivsus (a_w), n=3

	Enne autoklaavimist			Peale autoklaavimist		
	pH	Niiskus-%	a_w	pH	Niiskus-%	a_w
H0	6.5	42.3	1.000	6.5	43.2	1.000
STDEV	0.031	0.265	0.004	0.012	0.006	0.002
H1	6.7	40.7	1.000	6.4	43.4	1.000
STDEV	0.012	0.91	0.002	0.002	1.209	0.003
H2	6.6	41.7	1.000	6.4	42.1	1.000
STDEV	0.015	0.831	0.002	0.023	0.43	0.003
H3	6.6	41.9	1.000	6.4	41.8	1.000
STDEV	0.038	0.628	0.001	0.015	0.505	0.003

H0, H1-H3 proovide puhul oli oluline määrata, kas hirsi värvimine võib mõjutada pH-d. Tulemused näitasid, et pH langes vähesel määral.

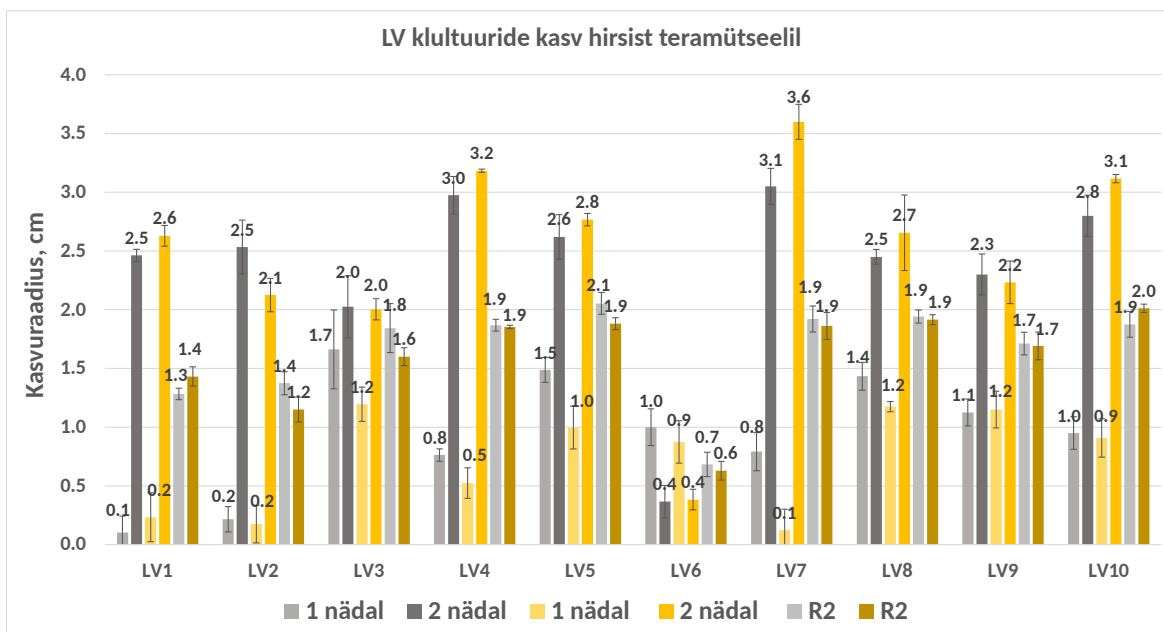
Autoklaavitud teraviljaga filterkotid avati puhastatud laminaarkapi all ning hirsi panemiseks petri tassile kasutati steriilseid lusikaid (Joonis 10). Igale petritassile pandi 22-24g hirssi, mis pressiti

ühtseks kihiks. Viimaseks tegevuseks oli petri tassil oleva hirsi inokuleerimine LV kultuuridega. Kultuure hoiustati õhuvahetusega inkubaatoris 22.5°C juures kolm nädalat ja iga nädala lõpus määrati seeneniidistiku levik stereomikroskoobi all. Viimasel pildil toimub stereomikroskoobi all petri tassil kaanele märgistamine, kus joonest allpool on mütseeliga osa ja märgistusest üleval mütseelita hirss.



Joonis 10. Hirsist teraviljamütseeli kasvukatse etapid: 1. Steriilne hirss ja laboritarvikud, 2. ja 3. Hirsi panek petri tassile, 4. LV kultuuri tüki lõikamine MEA söötmelt, 5. Hirsi inokuleerimine LV kultuuriga, 6. Värvitud vs värvimatta hirss, 7. Vaatlus stereomikroskoobiga ja 8. Mütseeli leviku märgistamine stereomikroskoobi abil.

Kõik hirsiga katsed teostati kolmes paralleelis(H0x3 ja H3x3), seeneniidistiku levik määrati iga (7 päeva) nädala tagant (Joonis 11). LV seenekultuuride kasvuparameetrite tabel on lisas (Lisa1).



Joonis 11. Seenekultuuride LV1-10 kasv hirsil: musta toiduvärviga (Sosa Ingredients) värvitud hirss – hall ja must ning vastavalt 1. ja 2. nädal, mittevärvitud nõ kontroll hirss - kollane ja pruun ning vastavalt 1. ja 2. nädal, R2 kasvukiirus (cm/nädalas), indikaator tähistab standardhälvet, n=3

MEA linnaseekstraktis olevad suhkrud ja muud ühendid on kergesti seente poolt lagundatavad ja omastatavad. Kui toimub seeneniidistikuga inokuleerimine MEA tüki ülekandmisega, siis seeneniidistikul on tarvis aega uue toitainete allikaga harjumiseks. Seetõttu, on peaaegu kõikide kümne LV kultuuri esimese nädala kasvud madalad.

Teisel nädalal oli selgelt näha, et seeneniidistik oli adapteerunud ning levis väga jõudsalt. Kuna esimese nädala ja teise nädala seeneniidistiku kasvuparameetrid oli väga erinevad, siis R2 tulemust värvitud ja värvimata hirsil puhul on keeruline arvesse võtta.

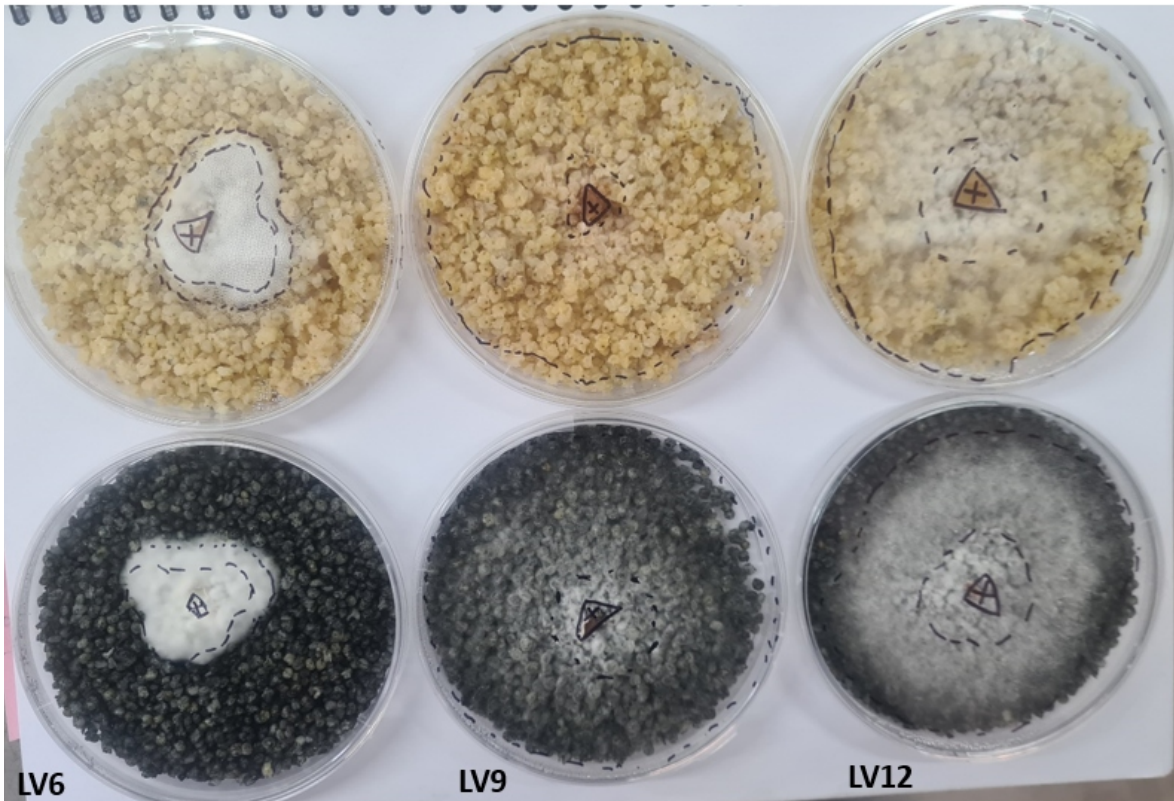
Värvitud hirsil peal kasvav seeneniidistik kasvas natuke halvemini, kui värvimata hirsil peal, seda näitavad kultuurid: LV1, LV4, LV5, LV7, LV8 ja LV10 (6 kultuuri 10-st). Sarnased tulemused oli LV3 ja LV9 kultuuridel. Kuna LV6 tüve sekveneerimise tulemused tulid alles hirsil katse lõpus, oli see lisatud katse valimisse. Joonisel 11 on kõige paremini näha LV6 kultuuri erinevust teiste LV kultuuride seast, kuna seenekultuuril olid võrreldes teistega kõige kehvemad kasvuparameetrid.

Kuigi R2 (kahe nädala keskmine kultuuride kasvukiirus) ja 2 nädala (teisel nädalal kultuuri kasv) on omavahel sarnased, ei saa neid ühtseteks pidada. R2 puhul on kõige parema kasvuparameetriga LV10 kultuur R2(LV10)=2 cm/nädalas, millele järgnevad LV4, LV5, LV7 ja LV8, kus R2=1.8 cm/nädalas. Kuid parema ülevaate kümne kultuuri levikust annab teise nädala kasv. Kõige kaugemale levis LV7 kultuur 2 nädal = 3.6 cm, millele järgnesid LV4 2 nädal = 3.2 cm ja LV10 2 nädal = 3.1 cm. R2 alusel kõige aeglasema levikuga olid LV6 ja LV2 kultuurid. Teise nädala kasvu parameetri alusel olid aga kõige aeglasema levikuga LV2, LV3 ja LV6 seenekultuurid.

Mütseeli morfoloogia hirsil

Need kultuurid, mis olid MEA petritassil vähem kohevad ja seeneniidistik harunev, ei erinenud visuaalselt ka teradel (Joonis 12). Need kultuurid, mis juba kasvasid tihedama ja kohevama niidistikuga olid seda ka hirsil. Visuaalsel võib kindlusega öelda, et LV6 mütseel ei ole *Hericium erinaceus* mütseeli sarnane.

Kirjanduses puudub info, et mütseeli kohevus oleks oluliseks parameetrik. Üldisel tähendab see, et kultuur on terve ja levikuks elujõuline. Vaatamata sama liigi esindajate omavahelisele visuaalsele erinevusele, on tööstuslikult oluline, et kultuur leviks ühes või teises keskkonnas võimalikult kiiresti. Jooniselt 12 on hästi näha, et LV9 ja LV12 on põhimõtteliselt sama kasvukiirusega, kuid visuaalselt kollase hirsiga peal oleks LV9 kasvu keeruline märgata ning võib teha vale järelduse, et kultuur on aeglase levikuga.



Joonis 12. H0 ja H3 hirsidel kasvavad LV kultuurid. Seeneiidistiku omadustest tulenev erinev hirsiga kaetus: LV6 - ei ole *Hericium erinaceus* esindaja, LV9 - peenema seeneiidistikuga tüvi ja LV12 - tiheda seeneiidistiku kihi moodustav tüvi.

4.1.3 Kasvuparameetrid erinevatel substraadidel

Antud uurimistöö etapis uuriti kümne LV seenekultuuri kasvuparameetreid erinevatel substraadi kombinatsioonidel (Tabel 5). Uuriti kliide ja mineraalsete lisandite mõju LV seenekultuuride kasvule. Lisaks kasutati substraadi retseptides lisandeid nagu kips 2% (CaSO_4) ja kustutamata lupja 2% (CaCO_3).

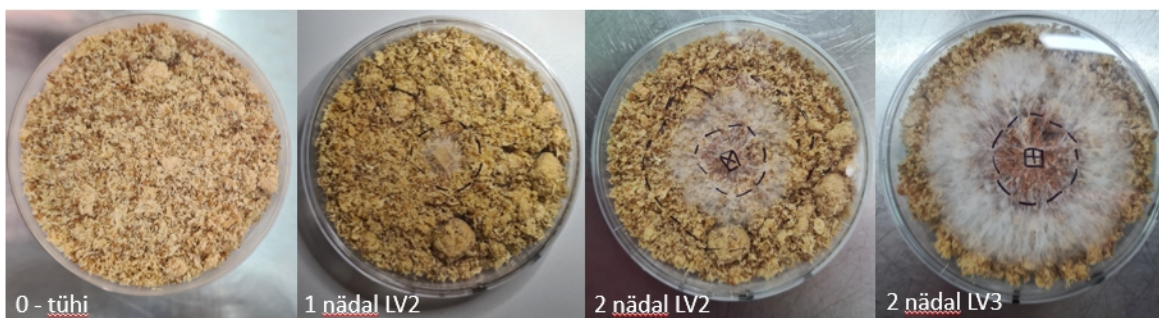
Tabel 5. Substraadi segude kombinatsioonid.

Nr.	Saepuru (%)	Kliid (%)	Lisandid (%)	Lühend
1	Saepuru (80%)	Nisuklii (20%)	-	0
2	Saepuru (78%)	Nisuklii (20%)	CaSO_4 (2%)	1
3	Saepuru (78%)	Nisuklii (20%)	CaCO_3 (2%)	2
4	Saepuru (80%)	Rukkiklii (20%)		0
5	Saepuru (78%)	Rukkiklii (20%)	CaSO_4 (2%)	1
6	Saepuru (78%)	Rukkiklii (20%)	CaCO_3 (2%)	2

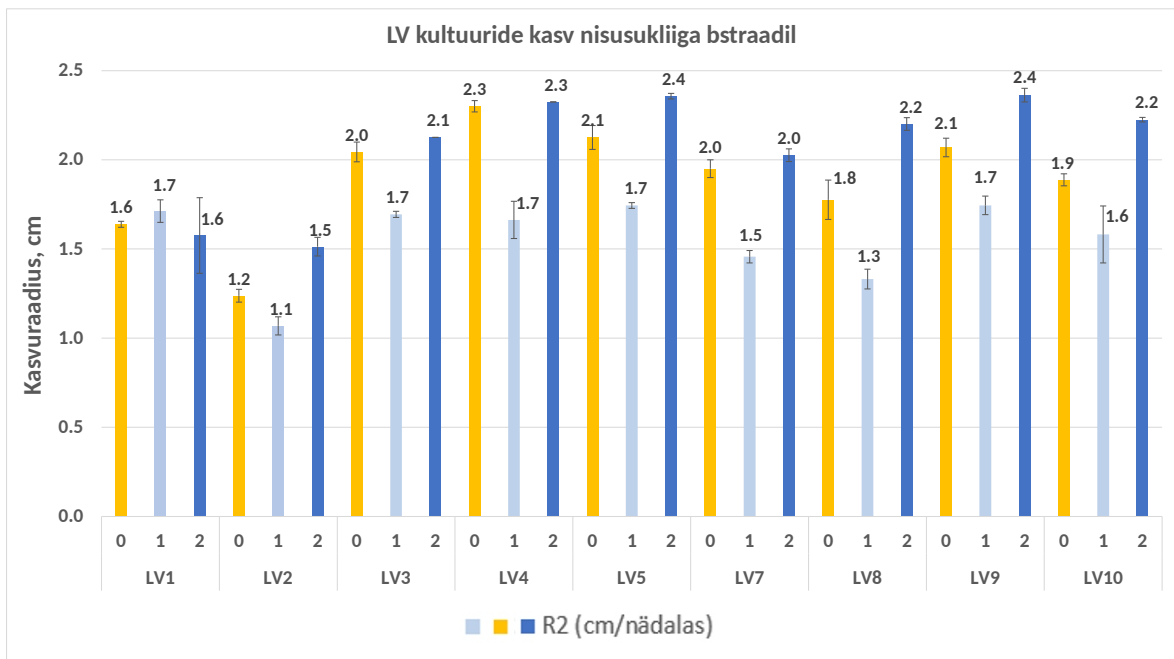
Substraadi-% kuivkaalust*

Erinevalt hirsist olid substraadi seguga filterkotid jäetud autoklaavi üleöö jahtuma. Järgmisel päeval, olid kõik substraadi kotid toodud eelnevalt puhastatud laminaarkapi alla ning sarnaselt hirsile katsele oli substraadi segu pandud petri tassile (Joonis 13). Kõik substraadi seguga petri tassid olid inokuleeritud samal päeval ning pandud 22.5°C õhuhahetusega inkubaatorisse kolmeks nädalaks. Sarnaselt hirsile testile oli seeneniidistiku levik mõõdetud joonlaua ja stereomikroskoobi abil. Kõigi kümne LV seenekultuuri kasvuparameetrid nisukliiga substraadil (Lisa 2) ja rukkikliiga substraadil (Lisa 3).

Kuna mõned LV seenekultuurid levisid substraadil kiiremini kui teised, siis arvestati ainult esimese ja teise nädala tulemustega (Joonis 13) (Joonis 14).



Joonis 13. Sae-puru substraadi katse, kus on välja toodud seenekultuuride LV2 ja LV3 mütseeli levik nädalate raames.



Joonis 14. Nisuklii substraatidel LV1-10 R2 kasvukiirused (cm/nädalas). Substraadi segud: 0 - 80% saepuru, 20% nisuklii; 1 - 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kips; 2 -78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kustutamata lubi. Joonisel on saepuru substraatidel seeneniidistiku kasv R2(cm/nädalas). Indikaator tähistab standardhälvet, n=3.

LV mütseeli esimese ja teise nädala kasvu nisukliiga substraadil saab eraldi vaadata lisast (Lisa 2).

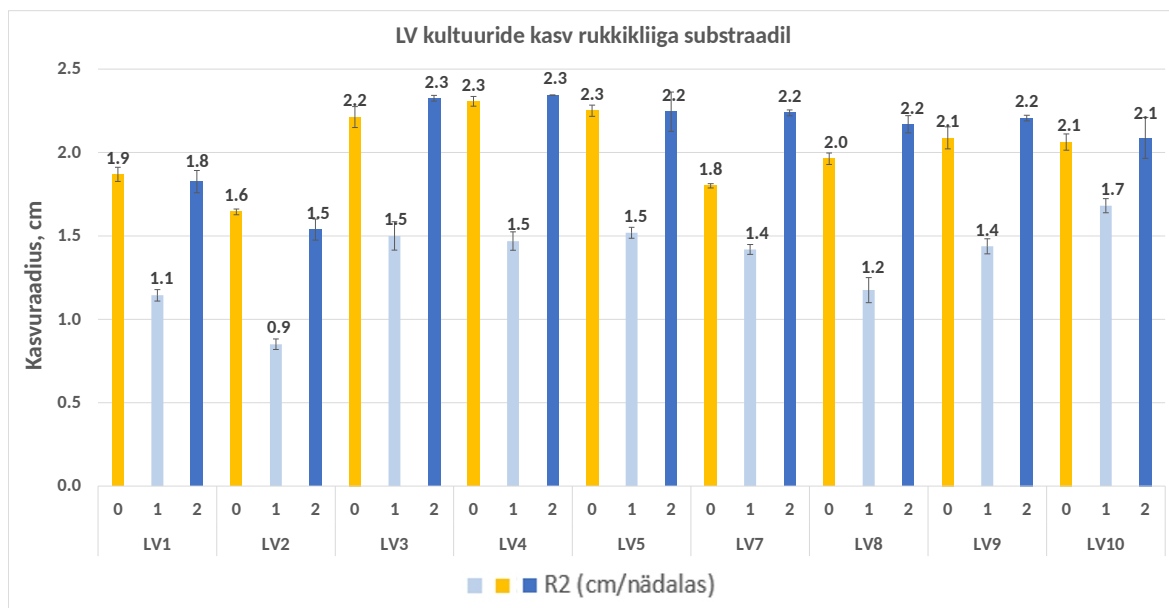
0 – 80% saepuru, 20% nisuklii

1 – 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kips

2 – 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kustutamata lubi

LV seenekultuurid kasvasid kiiremini nisukliiga 0 ja 2 substraatidel, erandiks oli LV1 seenekultuur, mis vähesel määral kasvas kiiremini 1 substraadil. LV2, LV5, LV8, LV9 ja LV10 kultuurid kasvasid kõige paremini N2 substraadil. LV3, LV4 ja LV7 puhul nisukliiga substraatidel 0 ja 2 puhul erinevust ei olnud. Antud tulemuste põhjal saab öelda, et rohkem kui pool kultuuridest kasvas kiiremini kustutamata lubjaga saepuru substraadil, mis on vastavuses ka teaduskirjandusega [32]. Teaduskirjanduse alusel oli leitud, et kipsi olemasolu (vähemalt vedelkultuuris) mõjutas negatiivselt seeneniidistiku kasvu [33], sarnane fenomen oli leitud ka meie katsest, kus peaaegu kõikidel ilma kipsita substraatidel seeneniidistiku kasv oli kiirem.

Üheksast LV kultuurist kõige kiirema kasvuga nisuklii 2 substraadi peal olid LV4 (R2=2.3 cm/nädalas), LV5 ja LV9 (R2=2.4 cm/nädalas). Kõige aeglasema kasvuga LV kultuurid nisuklii 2 substraadi peal olid LV1 (R2=1.6 cm/nädalas) ja LV2 (R2=1.5cm/nädalas).



Joonis 15. Rukkiklii substraatidel LV1-10 R2 kasvukiirused (cm/nädalas). Substraadi segud: 0 - 80% saepuru, 20% rukkiklii; 1 - 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kips; 2 - 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kustutamata lubi. Joonisel on saepuru substraatidel seeneniidistiku kasv R2(cm/nädalas). Indikaator tähistab standardhälvet, n=3.

Joonisel 15 on kujutatud kümne LV kultuuri kasvuparameetrid, mis on saadud kolme rukki sisaldusega substraadi pealt. Esimese ja teise nädala kasvuparameetreid saab täpsemalt vaadata lisast (Lisa 3).

0 – 80% saepuru, 20% rukkiklii

1 – 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kips

2 – 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kustutamata lubi

Nisuklii substraatide vahel oli rohkem erinevusi, kui rukkiklii substraatide tulemuste puhul. Kõige rohkem erines oma madala kasvuparameetriga rukkiklii 1 kipsi lisandiga substraat, mille kõige kõrgem tulemus oli LV10 kultuuri puhul (R2=1.7 cm/nädalas). Rukkikliiga substraatidel 0 ja 2 levivate kultuuride kasvukiirused olid peaaegu identsed ning erinevus esines vaid LV7 kultuuri puhul.

Kõige parem kasvukiirus rukkiklii substraatidel 0 ja 2 oli kultuuridel: LV3, LV4 ja LV5. Sarnaselt nisuklii substraatide tulemustele kõige kehvema kasvuparameetriga olid LV1 ja LV2 kultuurid. Kultuuride madalad kasvutulemused võivad olla seotud nende päritoluga, kuna mõlemad kultuurid (LV1 ja LV2) olid tellitud hästi tuntud hobikasvatajele mõeldud platvormilt. Seega, võib oletada, et neid tüvesid müüdi vanana. Kõik kultuurid, mis pärinevad 2023. aastast olid tellitud tööstuslike kultuuride arendajatelt, seega enamus nendes oli kiirema kasvuga.

Kui võrrelda nisukliiga substraate (0;2) ja rukkikliiga substraate (0;2), siis nisukliiga substraatidel LV kultuuride kasvukiirused (R2) jäid kahe ja alla kahe cm/nädalas vahele. Kuid rukkikliiga substraatide puhul kasvuparameeter (R2) oli põhiliselt üle kahe cm/nädalas. Tulemused näitavad, et kipsi lisandiga substraatidel olid kultuuride kasvuparameetrid valdavalt kõige madalamad.

Toitumislase teave alusel (Tabel 1) on 100g nisukliis kolm korda kõrgem süsivesikute sisaldus kui rukkikliides. Vaatamata sellele kasvasid LV kultuurid kiiremini rukkikliiga substraadil. Antud tendentsi on kinnitanud nii hobikasvatajad kui ka Tõrva tööstuses läbiviidud üksikud eksperimendid.

R2 saepuru substraadiga oli algselt planeeritud teostada ka tööstuslik katse, kuid ajapiirangute tõttu jäi tegevus teostamatta ning jääb tuleviku plaaniks.

4.1.4 Substraatide pH ja niiskussisalduse muutus

Kuna seene elutegevuse käigus substraadi pH muutub happeliseks, uuriti kuidas kipsi ja kustutamata lubja lisamine mõjutab substraadi pH taset (Tabel 5).

Tabel 5. Substraatide Niiskussisalduse ja pH muutus enne ja peale LV kultuuride nakatamist. Nisukliiga substraadid: 0 - 80% saepuru, 20% nisuklii; 1 - 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kips; 2 - 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kustutamata lubi. rukkikliiga substraadid: 0 - 80% saepuru, 20% rukkiklii; 1 - 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kips; 2 - 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kustutamata lubi. (n=3)

Enne seenekultuuriga nakatamist						
	Nisukliiga substraat			Rukkikliiga substraat		
Sub nr.	0	1	2	0	1	2
Niiskus%	69.0	67.3	65.3	67.2	67.1	69.0
STDEV	0.339	0.572	0.583	0.681	0.954	0.850
pH	5.8	7.5	5.5	5.8	7.8	5.4
STDEV	0.010	0.049	0.020	0.010	0.087	0.006
2 nädalat peale seenekultuuriga nakatamist						
	Nisukliiga substraat			Rukkikliiga substraat		
Sub nr.	0	1	2	0	1	2
Niiskus%	61.8	59.4	59.4	59.8	60.5	59.6
STDEV	0.247	0.513	0.656	0.551	0.603	0.404
pH	5.1	6.4	4.5	4.9	7.3	4.6
STDEV	0.017	0.023	0.012	0.006	0.020	0.021

Nisuklii ja rukkiklii substraatide pH-d olid kõige rohkem mõjutatud kipsi lisamisega. Nisuklii ja rukkikliiga 0 substraadi segude pH-d olid enne LV kultuuridega nakatamist 5.8, kuid kaks nädalat peale nakatamist langesid pH-d vahemikku 4.9-5.1. Kips toimib substraadi segus kui puhver ning seetõttu juba algselt happeline saepuru pH oli neutraliseeritud. Lisades substraadi segusse kipsi pH tõusis hüppeliselt 7.5 -7.8ni ning vaatamata pH langusele kahe nädala pärast, pH oli siiski võrreldes 0 nõ „kontroll“ substraadi seguga ja 2 substraadi (nisu- ning rukkiklii) seguga palju kõrgemal. Kipsi lisamisel tekkinud neutraalne keskkond ei soosinud sõltumata kliitüübist LV kultuuride kasvu. Substraadid, mille pH oli happelisem soodustasid LV mütseelide kiiremat kasvu. Teine substraadi lisand kustutamata lubi käitus kirjanduse info alusel ning ei omanud suur mõju substraadi pH-le. Kirjanduse alusel oli välja toodud, et alla 5 pH väärtuse mõjutab happeline keskkond LV mütseeli kasvu pärssivalt, kuid kõige paremad kasvukiiruse tulemused olid saadud rukkiklii substraadi segus 2, kus pH langes 5.4 -lt kuni 4.6 -ni.

Järgnevalt tasub teostada tööstuslik katse rukkiklii 2 substraadi seguga ning juba lähemalt uurida, kuidas on mõjutatud inkubatsiooni pikkus ning seente viljumine.

Kokkuvõte

Seente kultiveerimine on kasvanud traditsioonilisest tegevusest eraldi põllumajanduse tööstusharuks, mis statistiliste andmete alusel jätkab kasvavas trendis. Kultiveeritavate seente suurem kogus tuleb põhiliselt Aasiast, kuna seeni kasutatakse Aasia kultuuri ruumis rohkem kui teistes piirkondades. Vaatamata sellele on seente kultiveerimine arenemas Euroopas aga ka USA-s.

Seente kultiveerimine on muutunud populaarseks seente laialdasema kasutuse tõttu. Järjest rohkem kasutatakse neid söögiks ning nende funktsionaalsete ja toitaineliste omaduste tõttu tehakse seentest ekstrakte, uusi jooke ja snäkke.

Eduka seente tööstuse puhul on palju olulisi aspekte, millega arvestada, kuid nendest kõige olulisemad on seente kultiveerimise tingimused ning kasutatavad kultuurid – mütseeli kasvuparameetrid ja tootlikus.

Antud uurimistöo oli valminud koostöös ettevõttega Shroomwell Innovation OÜ. Uurimistöo käigus uuriti ettevõtte kultuuripangas olevate lõvilakk-korallnarmiku (*Hericum erinaceus*) kasvuparameetrid (mütseeli välimus, elujõulisus ja kasvukiirus) ning hinnati nende sobivust tööstuslikuks kasvatamiseks. Kultuuride kasvuparameetrid hinnati MEA tardsöötmele, teraviljal ja kuuel erineval saepuru substraadil.

MEA tardsöötmele kasvanud LV kultuurid erinesid nii visuaalselt kui ka kasvu poolest. Kõik kultuurid olid ettevõttesse saabumisel koheselt paigutatud kultuuripanka, seega tänu -80C külmutamisele säilitasid kultuurid oma esialgsed omadused. Seevastu, määravaks faktoriks oli seente kultuuride päritolu. Kultuurid, mis olid tellitud hobikasvatavate platvormidelt (LV1 ja LV2) olid madalamate kasvuparameetritega, kui need, mis olid tellitud kultuuride arendamisel spetsialiseerunud ettevõtetelt. Kultuuride morfoloogia alusel esines tihedam ja ühtlases ringis kasvav mütseel kultuuridel LV3, LV7, LV8 ja LV9 ning ebaühtlase ringjoones ja hargnevustega mütseel esines kultuuridel LV1, LV2, LV4, LV5 ja LV10. MEA söötmele kõige kiirema kasvuga kultuurid olid LV4, LV5 ja LV8.

Seente kultuuride kasvuparameetrid olid hinnatud ka hirsil, kuna oluline, et kasvuparameetrid MEA tardsöötmele kajastusid ka nakatatud teravilja valmistamisel. Mütseeli paremaks hindamiseks oli hirss tänu toiduvärvile värvitud mustaks, kuid tegelikult lihtsamaks see määramist ei teinud. Lisaks oli märgatud, et hirsi värvimine mõjus kergelt inhibeerivalt mütseeli kasvule. Hirsil kõige kiirema kasvuga kultuurid olid LV4, LV5, LV7, LV8 ja LV10.

Kolmandas etapis uuriti LV kultuuride kasvu kuuel erineval substraadil. Võrreldi erinevate kliide ja kipsi ning kustutamata lubja mõju kultuuride kasvuparameetritele. Kipsi lisamine mõjutas sõltumata klii tüübist negatiivselt ning kustutamata lubi soodustas kiiremat kasvu. pH poolest saavutas kipsiga substraat (1) neutraalse pH ning ilma nõ kontroll (0) ja lubjaga (2) substraadi segud olid happelisemad. Kiirem LV kultuuride kasv oli märgatud rukkiklii ja kustutamata lubja lisandiga substraadi segul. Nisuklii kui ka rukkiklii saepuru substraadidel kõige kiirema kasvuga kultuurid olid LV4 ja LV5.

Kolmele katse etapile toetudes olid kõige kiiremad kasvud kultuuridel LV4 ja LV5 ning need sobivad seente tööstuse jaoks. Kuid kultuurid LV1 ja LV2 olid liiga aeglase kasvuga ning need ei sobi seente tööstuslikuks kultiveerimiseks.

Tuleviku perspektiivis oleks planeeritud läbi viia LV4 ja LV5 kultuuridega tööstuslik kultiveerimine rukkiklii ja kustutamata lubja substraadi segul ning määrata nende kultuuride tootlikus.

Abstract

Mushroom cultivation has grown from a marginal tradition into a separate agricultural industry, which continues to show growth. Due to strong cultural influence, fungi are cultivated mainly in Asian countries. Nevertheless, mushroom cultivation sector is also on the rise in Europe and USA.

There are several reasons why the consumption of mushrooms is on the rise. Firstly, people have started actively including mushrooms in their everyday meals. Secondly, the discovered functional properties of fungi gave a boost to the functional beverage market and lastly mushroom snacks are also gaining more popularity.

In order for the mushroom industry to be successful it needs to have the main key elements like optimal cultivation conditions for efficient mushroom growing and also high-quality mushroom cultures.

The current master's thesis was conducted in cooperation with an Estonian mushroom cultivation company Shroomwell Innovation OÜ. Main goal of the work was to determine the growing properties of Lion's Mane (LV, *Hericium erinaceus*) cultures and to assess the possibility of using those strains in big scale cultivation process. LV Properties like appearance, viability and growth speed of ten strains of LV (LV1-LV10) were determined in three conditions: MEA media, millet spawn and on substrate material.

It was noted that the origin of the culture plays an important role in the quality. LV1 and LV2 cultures that were purchased from e-markets intended for hobby mushroom growers, had significantly lower mycelium growing speed, compared to the fungal strains specially developed for industrial mushroom cultivation.

From the morphological aspect, LV cultures could be divided into two categories. In the first category the cultures have an even circular growing pattern and dense mycelium: LV3, LV7, LV8 and LV9. The second category contains cultures with uneven edge of growing and branching of mycelium: LV1, LV2, LV4, LV5 ja LV10. On MEA media strains LV4, LV5 and LV8 presented the fastest growth rate.

Growth parameters of the LV cultures were determined also on millet spawn. The millet was stained with black food dye to create more contrast between mycelium and background. Nevertheless, stereomicroscope was still needed for monitoring the growth. After the incubation period it was discovered that food dye had a minor inhibitory effect on mycelium growth compared to control. The fastest growing cultures on millet spawn were LV4, LV5, LV7, LV8 and LV10.

In the final stage of the experimental work the LV culture growth parameters were analyzed on six different substrates with differences in bran type and mineral additives, either gypsum or lime. The presence of gypsum in substrate mix had an inhibitory effect and presence of lime made mycelium grow slightly faster. From the aspect of pH, the gypsum had a strong buffering effect and pH stayed almost neutral. Lime didn't have a buffering effect and those substrates became more acidic during growth. Due to LV preference for slightly acidic growth environment, the best growth was seen on substrates that included rye bran and lime. The fastest growth under such conditions was seen for LV4 and LV5 cultures.

Based on the information derived from three different conditions, we can assert firmly that cultures LV4 and LV5 are the most suitable candidates for the upcoming big scale mushroom production test. For the best substrate material substrate mix nr 2, containing rye, will be used. For both cultures, the large-scale growing and fruiting properties at the right production conditions will be determined

Tänuavaldused

Suur tänu juhendajatele Allan Olspert ja Siim Raadikule, kelle juhendamisel oli antud lõputöö teostatud. Suured tänud ka Shroomwell seentööstuse meeskonnale toetuse ja vastuleikkuse eest.

Kasutatud kirjandus

- [1] Mukundraj Govindrao Rathod, "Mushroom Farming: Exploring Varieties, Cultivation Strategies, and Endless Possibilities," *Research & Reviews in Biotechnology & Biosciences*, vol. 10, no. 2, pp. 2321–8681, 2024, doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.10677316>.
- [2] S. Bijla and V. P. Sharma, "Status of mushroom production: Global and national scenario," *Mushroom Res*, vol. 32, no. 2, pp. 91–98, Dec. 2023, doi: [10.36036/MR.32.2.2023.146647](https://doi.org/10.36036/MR.32.2.2023.146647).
- [3] Paul Stamets, *Growing Gourmet And Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press, 1993.
- [4] C. Sanchez, "Modern aspects of mushroom culture technology," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 64, no. 6, pp. 756–762, Jun. 2004, doi: [10.1007/s00253-004-1569-7](https://doi.org/10.1007/s00253-004-1569-7).
- [5] Mushroomshelves, "Button Mushroom Cultivation Equipment." Accessed: Jan. 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.mushroomshelves.com/>
- [6] Louise George Kittak, "Shiitake Mushroom Farming on the Kunisaki Peninsula, delicious organic mushrooms you have to try." Accessed: Jan. 08, 2025. [Online]. Available: <https://www.japanesefoodguide.com/shiitake-mushrooms-kunisaki-peninsula/>
- [7] W. Bin, X. Zhenzhen, Y. Chao, G. Letu, and Z. Long, "The Qingyuan Mushroom Culture System as Agricultural Heritage," *J Resour Ecol*, vol. 5, no. 4, pp. 314–319, Dec. 2014, doi: [10.5814/j.issn.1674-764x.2014.04.005](https://doi.org/10.5814/j.issn.1674-764x.2014.04.005).
- [8] De John Worlidge, *Systema Horti-culturæ: Or, the Art of Gardening. Book III*. London: T. Burrell & W. Hensman, 1677.
- [9] R&R Cultivation, "The History of Mushroom Farming." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://rrcultivation.com/blogs/mn/the-history-of-mushroom-farming#:~:text=This%20method%20was%20later%20adopted,established%20in%201896%20by%20W.>
- [10] S. Singhal *et al.*, "Mushroom Cultivation, Processing and Value-added Products: A Patent Based Review," *Recent Pat Food Nutr Agric*, vol. 10, no. 1, pp. 3–19, Jan. 2019, doi: [10.2174/2212798410666180604101353](https://doi.org/10.2174/2212798410666180604101353).
- [11] Ryan Daily, "Expo West trendspotting: Mushrooms have their moment in snacks, beverages." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2023/03/17/expo-west-trendspotting-mushrooms-have-their-moment-in-snacks-beverages/>
- [12] Markets & Data, "Global Mushroom Coffee Market Assessment," 2024. Accessed: Jan. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.marketsanddata.com/industry-reports/mushroom-coffee-market>
- [13] Polaris Market Research, "Mushroom Coffee Market Share, Size, Trends, Industry Analysis Report, By Form (Grounded, Powder), By Mushroom Extract, By Caffeine Content, By Packaging, By Distribution Channel, By Region, and Segment Forecasts, 2023-2032," 2023. Accessed: Jan. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/mushroom-coffee-market>
- [14] J. M. D. G. T. K. A. N. C. S. B. W. P. I. D. U. P. D. A. P. P. Mukundraj Govindrao Rathod, Jivan Munja Dhotare, Gautam Tanaji Kamble, Aarti Narottam Chopda, Shreya Babanrao Wahule, and Umesh Pravin Dhuldhaj, "Comparative Study of Nutritional Composition of Oyster Mushroom *Pleurotus florida* Cultivated on Different Consortiums of Substrates," *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, vol. 10, no. 1, pp. 2348–7968, Jan. 2023.
- [15] R. Amirta, E. Herawati, W. Suwinarti, and T. Watanabe, "Two-steps Utilization of Shorea Wood Waste Biomass for the Production of Oyster Mushroom and Biogas – A Zero Waste Approach,"

Agriculture and Agricultural Science Procedia, vol. 9, pp. 202–208, 2016, doi: 10.1016/j.aaspro.2016.02.127.

- [16] W. Broussard, "How to Grow Mushrooms Indoors." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://northspore.com/blogs/the-black-trumpet/how-to-grow-mushrooms-indoors?srsltid=AfmBOorXQdQVac8GHV3HHO7wKVqun1l8rUAFNgF6Z5oJ5e53cDFcyQiv>
- [17] MAXIMIZE MARKET RESEARCH, "Mushroom Market – Global Industry Analysis and Forecast (2024-2030)," 2024.
- [18] 4AG Robotics, "Changing the mushroom harvesting business." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://4ag.ai/mushroom-harvesting-robot/>
- [19] C. Li and S. Xu, "Edible mushroom industry in China: current state and perspectives," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 106, no. 11, pp. 3949–3955, Jun. 2022, doi: 10.1007/s00253-022-11985-0.
- [20] Sangeeta, D. Sharma, S. Ramniwas, R. Mugabi, J. Uddin, and G. A. Nayik, "Revolutionizing Mushroom processing: Innovative techniques and technologies," *Food Chem X*, vol. 23, p. 101774, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.fochx.2024.101774.
- [21] S. Bijla and V. P. Sharma, "Status of mushroom production: Global and national scenario," *Mushroom Res*, vol. 32, no. 2, pp. 91–98, Dec. 2023, doi: 10.36036/MR.32.2.2023.146647.
- [22] "Mushroom Drinks Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Mushroom Coffee, Mushroom Tea), By Form (Liquid, Powder), By Distribution Channel, By Region, And Segment Forecasts, 2024 - 2030," 2024.
- [23] "Shiitake Mushroom Chips Market Size, Share & Trends Analysis Report By Flavor (Spicy, Wasabi, Sea Salt, Garlic), By Distribution Channel (Hypermarkets & Supermarkets, Convenience Stores), By Region, And Segment Forecasts, 2024 - 2030," 2024.
- [24] E. Webb, "Ultimate Guide to Mushroom Substrates." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: https://urban-farm-it.com/blogs/mushroom-cultivation/guide-to-mushroom-substrates?srsltid=AfmBOoq8xcM1yhhgqvdaXO8T7h5KMY4kmNFbf0Bc5HkyRzlj_rg3LoHN
- [25] "Rukkiklii" Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://tka.nutridata.ee/et/toidud/3532>
- [26] "Nisuklii" Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://tka.nutridata.ee/et/toidud/297>
- [27] J. Wu *et al.*, "Calcium dynamics during the growth of *Agaricus bisporus*: implications for mushroom development and nutrition," *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, vol. 10, no. 1, p. 99, Sep. 2023, doi: 10.1186/s40538-023-00471-y.
- [28] N. Attias, O. Danai, N. Ezov, E. Tarazi, and J. Grobman, "Developing novel applications of mycelium based bio-composite materials for design and architecture," 2017.
- [29] Y. Zhang *et al.*, "Healthy function and high valued utilization of edible fungi," *Food Science and Human Wellness*, vol. 10, no. 4, pp. 408–420, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.fshw.2021.04.003.
- [30] U.-K. Choi, O.-H. Lee, and Y.-C. Kim, "Effect of Calcinated Oyster Shell Powder on Growth, Yield, Spawn Run, and Primordial Formation of King Oyster Mushroom (*Pleurotus Eryngii*)," *Molecules*, vol. 16, no. 3, pp. 2313–2322, Mar. 2011, doi: 10.3390/molecules16032313.
- [31] J. Woodrom, "Mushrooms: 'Lime' and 'Gypsum', are they needed?" Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://wjwoodrow.wordpress.com/2020/03/25/mushrooms-lime-and-gypsum-and-why-they-should-be-left-out-of-your-mix/>
- [32] "Using Gypsum In Mushroom Substrate: Everything To Know." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://gromagik.com/blogs/grow-magik-mushroom-cultivation-blog/using-gypsum-in-mushroom-substrate-everything-you-need-to-know#:~:text=By%20adding%20gypsum%20to%20the,colonize%20the%20substrate%20more%20easily.>

- [33] N.-H. Lee, M.-H. Im, and U.-K. Choi, "Calcium Absorption by the Fruitbody of Saesongi (*Pleurotus eryngii*) Mushroom," *Korean Society of Food Science and Technology*, vol. 15, no. 2, pp. 308–311, 2006.
- [34] J. Cervera-Gascó, J. E. Pardo, M. Álvarez-Ortí, E. López-Mata, D. Cunha Zied, and A. Pardo-Giménez, "An intelligent mushroom strain selection model based on their quality characteristics," *Food Biosci*, vol. 56, p. 103232, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.fbio.2023.103232.
- [35] D. J. Royse and V. Wilkinson, "Care and handling of cultures of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) ," Pennsylvania. Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://plantpath.psu.edu/about/facilities/mushroom/cultures-spawn/care-handling.pdf>
- [36] G. Lombardo, "Lion's mane | cauZmik Guide." Accessed: Jan. 09, 2025. [Online]. Available: <https://medium.com/cauzmik/lions-mane-cauzmik-guide-f9e827ad6c39>
- [37] X. Zeng, H. Ling, J. Yang, J. Chen, and S. Guo, "Proteome analysis provides insight into the regulation of bioactive metabolites in *Hericium erinaceus*," *Gene*, vol. 666, pp. 108–115, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.05.020.
- [38] Y. Xue *et al.*, "Optimization of preparation process and antioxidant activity of the chelate of a *Hericium erinaceus* polysaccharide with zinc," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 15, no. 2, pp. 2039–2048, Apr. 2021, doi: 10.1007/s11694-020-00795-5.
- [39] K.-C. Lee *et al.*, "Induction Apoptosis of Erinacine A in Human Colorectal Cancer Cells Involving the Expression of TNFR, Fas, and Fas Ligand via the JNK/p300/p50 Signaling Pathway With Histone Acetylation," *Front Pharmacol*, vol. 10, Oct. 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.01174.
- [40] D. Ratto *et al.*, "*Hericium erinaceus* Improves Recognition Memory and Induces Hippocampal and Cerebellar Neurogenesis in Frail Mice during Aging," *Nutrients*, vol. 11, no. 4, p. 715, Mar. 2019, doi: 10.3390/nu11040715.
- [41] K.-H. Wong *et al.*, "Peripheral Nerve Regeneration Following Crush Injury to Rat Peroneal Nerve by Aqueous Extract of Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. (Aphyllorphomycetidae)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, no. 1, Jan. 2011, doi: 10.1093/ecam/neq062.
- [42] X.-X. Shi, H.-P. Qiu, J. Wang, Z. Zhang, Y.-L. Wang, and G.-C. Sun, "A handy method to remove bacterial contamination from fungal cultures," *PLoS One*, vol. 14, no. 11, p. e0224635, Nov. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224635.
- [43] American Type Culture Collection, "Preservation and Recovery of Filamentous Fungi," Virginia, 2022.
- [44] K. Kütt, "Musta pässiku (*Inonotus obliquus*) levik, mädaniku kahjustused puudel ning kasvukiirus puhaskultuuris," *Eesti Maaülikool*, 2023.
- [45] D. Rich Milton R., C. Esperanza C., K. Sofronio P., and R. Renato G., "Optimization of culture conditions for mycelial growth and fruiting body production of naturally-occurring Philippine mushroom *Lentinus swartzii* Berk," *J Appl Biol Biotechnol*, May 2021, doi: 10.7324/JABB.2021.9303.
- [46] Precision Laboratories, "pH 4.5-10 Test Strip, 3 pad." Accessed: Jan. 14, 2025. [Online]. Available: <https://www.preclaboratories.com/product/ph-4-5-10-test-strip/>
- [47] A. S. - and S. M. -, "Nutritional Analysis and Organoleptic Evaluation of Millets Products," *International Journal For Multidisciplinary Research*, vol. 5, no. 5, Oct. 2023, doi: 10.36948/ijfmr.2023.v05i05.8085.
- [48] A. Geffert, J. Geffertova, and M. Dudiak, "Direct Method of Measuring the pH Value of Wood," *Forests*, vol. 10, no. 10, p. 852, Sep. 2019, doi: 10.3390/f10100852.

- [49] M. Liu *et al.*, "Isolation and Evaluation of Erinacine A Contents in Mycelia of *Herichium erinaceus* Strains," *Foods*, vol. 13, no. 11, p. 1649, May 2024, doi: 10.3390/foods13111649.
- [50] C. Shanmugaraj, K. Saranraj, and M. Biswas, "Optimizing growth conditions for shiitake mushroom cultivation in Birbhum, West Bengal: A study on media, temperature, and ph variations," *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, vol. 8, no. 5, pp. 219–223, Jan. 2024, doi: 10.33545/26174693.2024.v8.i5c.1072.
- [51] A. H. Ab Majid *et al.*, "Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae)," *Asian Pac J Trop Biomed*, vol. 5, no. 9, pp. 707–713, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.apjtb.2015.04.012.
- [52] D. L. Narh, M. Obodai, D. Baka, and M. Dzomeku, "'The efficacy of sorghum and millet grains in spawn production and carpophore formation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq . Ex . Fr) Kummer.' (2011).," *Int Food Res J*, vol. 8, no. 3, pp. 1143–1148, 2011.

Lisad

Lisa 1

Tabel 1. Kümne LV seenekultuuri seeneniidistiku kasvuparameetrid värvitud ja värvimatta (KK) hirsil.

Kasvuraadius	LV1	LV1 (KK)	LV2	LV2 (KK)	LV3	LV3 (KK)	LV4	LV4 (KK)	LV5	LV5 (KK)
1 nädal (cm)	0.1	0.2	0.2	0.2	1.7	1.2	0.8	0.5	1.5	1.0
STDEV	0.139	0.208	0.108	0.161	0.336	0.146	0.053	0.130	0.107	0.182
2 nädal (cm)	2.5	2.6	2.5	2.1	2.0	2.0	3.0	3.2	2.6	2.8
STDEV	0.052	0.088	0.229	0.141	0.265	0.090	0.159	0.014	0.189	0.053
R2 (cm/nä- dalas)	1.3	1.4	1.4	1.2	1.8	1.6	1.9	1.9	2.1	1.9
STDEV	0.049	0.081	0.098	0.106	0.208	0.077	0.050	0.014	0.093	0.051
Kasvuraadius	LV6	LV6 (KK)	LV7	LV7 (KK)	LV8	LV8 (KK)	LV9	LV9 (KK)	LV10	LV10 (KK)
1 nädal (cm)	1.0	0.9	0.8	0.1	1.4	1.2	1.1	1.2	1.0	0.9
STDEV	0.156	0.180	0.163	0.177	0.118	0.043	0.115	0.156	0.139	0.163
2 nädal (cm)	0.4	0.4	3.1	3.6	2.5	2.7	2.3	2.2	2.8	3.1
STDEV	0.138	0.088	0.153	0.150	0.063	0.321	0.175	0.181	0.175	0.035
R2 (cm/nä- dalas)	0.7	0.6	1.9	1.9	1.9	1.9	1.7	1.7	1.9	2.0
STDEV	0.103	0.079	0.111	0.114	0.056	0.043	0.096	0.118	0.109	0.035

Lisa 2

Tabel 2. Nisukliiga substraadi kombinatsioonidel kasvatatud LV kultuurid. . Substraadi kombinatsioonid: 0 – 80% saepuru, 20% nisuklii; 1 – 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kips; 2 – 78% saepuru, 20% nisuklii, 2% kustutamata lubi

Kasv	LV1			LV2			LV3			LV4		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
1 nädal (cm)	0.7	0.8	0.4	0.4	0.5	0.2	1.0	0.9	0.5	1.1	0.7	0.9
STDEV	0.053	0.071	0.301	0.495	0.177	0.336	0.071	0.071	0.000	0.071	0.124	0.035
2 nädal (cm)	2.6	2.6	2.7	2.1	1.7	2.8	3.1	2.5	3.7	3.6	2.6	3.8
STDEV	0.018	0.141	0.301	0.035	0.053	0.053	0.088	0.018	0.000	0.035	0.194	0.000
R2 (cm/nädalas)	1.6	1.7	1.6	1.2	1.1	1.5	2.0	1.7	2.1	2.3	1.7	2.3
STDEV	0.017	0.063	0.213	0.035	0.051	0.052	0.055	0.017	0.000	0.032	0.104	0.000
Kasv	LV5			LV7			LV8			LV9		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
1 nädal (cm)	1.1	0.8	1.1	1.2	0.9	1.1	0.9	0.8	1.4	1.2	1.1	1.3
STDEV	0.071	0.035	0.018	0.071	0.159	0.000	0.141	0.088	0.000	0.053	0.053	0.053
2 nädal (cm)	3.2	2.7	3.6	2.7	2.1	3.0	2.7	1.9	3.0	3.0	2.4	3.5
STDEV	0.212	0.018	0.035	0.071	0.035	0.035	0.177	0.071	0.035	0.247	0.247	0.053
R2 (cm/nädalas)	2.1	1.7	2.4	2.0	1.5	2.0	1.8	1.3	2.2	2.1	1.7	2.4
STDEV	0.067	0.016	0.016	0.050	0.035	0.035	0.110	0.055	0.035	0.052	0.052	0.037
Kasv	LV10											
	0	1	2									
1 nädal (cm)	1.1	1.0	1.3									
STDEV	0.106	0.000	0.018									
2 nädal (cm)	2.7	2.2	3.2									
STDEV	0.035	0.159	0.018									
R2 (cm/nädalas)	1.9	1.6	2.2									
STDEV	0.034	0.159	0.013									

Lisa 3

Tabel 3. rukkikliiga substraadi kombinatsioonidel kasvatatud LV kultuurid. Substraadi kombinatsioonid: 0 – 80% saepuru, 20% rukkikliid; 1 – 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kips; 2 – 78% saepuru, 20% rukkiklii, 2% kustutamata lubi, n=3

Kasv	LV1			LV2			LV3			LV4		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
1 nädal (cm)	0.9	0.7	0.7	0.6	0.3	0.4	1.0	0.8	1.1	1.0	0.8	1.0
STDEV	0.053	0.035	0.212	0.018	0.035	0.141	0.088	0.106	0.018	0.053	0.071	0.000
2 nädal (cm)	2.9	1.6	3.0	2.7	1.5	2.7	3.4	2.2	3.6	3.6	2.2	3.7
STDEV	0.071	0.194	0.071	0.318	0.071	0.071	0.088	0.141	0.053	0.035	0.088	0.053
R2 (cm/nä- dalas)	1.9	1.1	1.8	1.6	0.9	1.5	2.2	1.5	2.3	2.3	1.5	2.3
STDEV	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0
Kasv	LV5			LV7			LV8			LV9		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2	0	1	2
1 nädal (cm)	1.1	0.7	0.9	0.7	0.5	1.2	0.9	0.6	1.1	1.1	0.9	1.0
STDEV	0.035	0.088	0.388	0.018	0.035	0.018	0.035	0.106	0.212	0.177	0.053	0.018
2 nädal (cm)	3.4	2.3	3.6	2.9	2.3	3.3	3.0	1.8	3.2	3.1	2.0	3.4
STDEV	0.106	0.035	0.124	0.018	0.053	0.301	0.177	0.106	0.053	0.071	0.088	0.071
R2 (cm/nä- dalas)	2.3	1.5	2.2	1.8	1.4	2.2	2.0	1.2	2.2	2.1	1.4	2.2
STDEV	0.034	0.033	0.118	0.013	0.029	0.018	0.035	0.075	0.051	0.066	0.045	0.017
Kasv	LV10											
	0	1	2									
1 nädal (cm)	1.0	1.0	1.2									
STDEV	0.053	0.071	0.141									
2 nädal (cm)	3.1	2.3	3.0									
STDEV	0.124	0.053	0.247									
R2 (cm/nä- dalas)	2.1	1.7	2.1									
STDEV	0.049	0.042	0.123									

Lisa 4

1. MEA söötme valmistamine (1L) ja LV seene tüvede külvamine
 - 1.1 Keeduanumasse valatakse 800 ml ja keeduklaasi 200 ml destilleeritud vett.
 - 1.2 Kaaluakse 20 g/L linnaseekstrakti, lisatakse keeduklaasi ja segatakse kuni linnasekstrakt on lahustunud. Kaalutakse 20 g/L agarit, lisatakse keeduklaasi ja segatakse ühtlaseks seguks.
 - 1.3 Keeduanumas olev vesi ajatakse keemiseni ning seejärel lisatakse keeduklaasis olev linnaseekstrakti ja agari segu. Kuumust vähendatakse ning kuumutatakse, kuni kõik komponendid on ühtselt lahustunud. Aeglasel segamisel mõõdetakse, et söötme temperatuur ei oleks üle 95°C.
 - 1.4 Võetakse lameda põhjaga 250 ml klaaskolvid ja täidetakse 50% mahu ulatuses ehk 125 ml. Kolvi suletakse pealt poolt fooliumiga.
 - 1.5 Söötmed autoklaavitakse 121°C juures 15 min. Peale autoklaavimist lastakse söötmetel jahtuda kuni 35 – 40°C ja valatakse puhta laminaarkapi all steriilsetesse petri tassidesse. Jätakse tarduma.
 - 1.6 Spetsiaalsete kinnastega võetakse välja sügavkülmast krüoviaalid. Krüoviaalid hoiustatakse toatemperatuuril, kuni nendes olev 10% glütserooli lahus on täiesti ülessulanud.
 - 1.7 Krüoviaalid desinfitseeritakse ja pannakse laminaarkapi alla. Leegis steriliseeritud metall aasaga võetakse seenekultuuriga (MEA tardsöötme tükikesed) ja asetatakse MEA tardsöötmega petri tassi keskele.
 - 1.8 Petri tassid parafilmitakse ning hoiustatakse 22.5°C juures inkubaatoris.
2. Hirsist teramütseeli valmistamine ja LV seene tüvede külvamine
 - 2.1 Hirss jäetakse veega seisma 1 tunniks ning hiljem pestakse läbi mitu korda. Seejärel, jäetakse vette 24 tunniks.
 - 2.2 Leotatud hirss pestakse läbi ja pannakse puhta veega potti ning keedetakse 10 minutit. Seejärel kurnatakse hirss liigest veest ja pannakse puhatle alusele. Hirss laotatakse laiali ja segatakse iga 5 minuti tagant, et liigne vesi terade pinnalt aurustuks ning toimuks kiiremini jahtumisprotsess.
 - 2.3 Kui terad on niisked, kuid ei kleepu käte külge, on terad piisavalt kuivanud. Hirss pannakse kolme konteinerisse, kuhu lisatakse vastavalt juhendile 2g/kg musta toiduvärvi ning samas koguses purustatud söetablette. Hirss segatakse värvainetega ühtselt läbi. (Võetakse hirsi proovid pH, veeaktiivsuse ja niiskussisalduse mõõtmiseks.)
 - 2.4 Värvitud hirss pannakse filterkottidesse (700 g/kott), volditakse ning õhk pressitakse välja. Kotid asetatakse autoklaavi ning autoklaavitakse 125 °C 2,5 tundi. Seejärel, võetakse kotid välja ja jäetakse laminaarkapi alla üleöö jahtuma. Teramütseeli valmistamiseks lisatakse LV kultuur otse filterkotti ning kott keevitatakse kinni.
 - 2.5 Hirsiga kott tehakse lahti ning pannakse külili, et ülevalt poolt ei satuks mikroorgansmid sisse ja lihtsalt selleks, et oleks mugavam töötada. Hirss juhatakse rohkem kotisuudme juurde ning kott avatakse. Hoides lusikat kaugemast otsast võetakse kotti puudutamatta hirssi ning pannakse petri tassi sisse, mida koheselt suletakse kaanega. Pesti tassi sisse pannakse kaks ja pool lusikatait hirssi ning pressitakse ühtlaseks kihiks.
 - 2.6 Hirsiga petri tasside inokuleerimiseks kasutatakse eelnevalt MEA tardsöötme kasvatatud LV kultuure. Inokuleerimisel lõigatakse seeneniidistiku välisest piirjoonest kolmnurkne tükkike ja asetatakse see hirsiga petri tassi keskele. Nakatatud petri tassid hoiustatakse 22.5°C sisetemperatuuriga inkubaatoris 3 nädalat.

2.7 Seeneniidistiku levimist määratakse steromikroskoobi abil iga 7 päeva tagant.

3. Substraatide valmistamine ja inokuleerimine

Sarnaselt hirsile toimub saepuru substraadi valmistamine.

3.1 Suurde anumasse kaalutakse kuivkaalujärgi saepuru, kliisid ja teisi lisandeid.

3.2 Lisatakse kuivkaaluga samapalju kraanivett. Segatakse aktiivselt 10 min. Lastakse seista 2 h, segatakse uuesti mass läbi. Seejärel, võetakse niiskuse analüüsi proov, mida analüsitakse halogeen niiskusanalüsaatoriga. Substraadi materjali niiskussisaldus peab jääma vahemikku 60 – 70%. Kui on alla selle, lisatakse vett juurde ning lastakse uuesti 1h seista.

3.3 Kui substraadi materjali niiskus on määratud vahemikus, pannakse saepuru substraat filterkottidesse. Antud katse raames kaalutakse filterkotti 1 kg substraadi materjali, pressitakse maksimaalselt õhk välja ja koti ülemine äär volditakse kokku. Tulemuseks on nõ kõva "substraadi brikett".

3.4 Saepuru substraadiga kotid laotakse tihedalt autoklaavi ja autoklaavitakse 121°C kuumusel 3h. Peale tsükli lõppu jäetakse substraadid autoklaavi sisse, kuni need täielikult maha ei jahtu.

3.5 Valmistatakse ette puhas laminaarkapp. Tehakse lahti autoklaav ja desinfitseeritud kinnastega võetakse steriilsed substraadi kotid välja ja pannakse laminaarkappi alla.

3.6 Sarnaselt hirsile, võetakse steriilse lusikaga substraadi materjal ja laotakse ühtlase kihina petri tassile, nakatatakse keskelt LV kultuuriga ning inkubeeritakse 22.5°C juures 3 nädalat.