

# Systeminnovatie in teelt en voeding van champignons

Gerben Straatsma, Anton Sonnenberg, Robert van Loo

© 2007 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Plant Research International B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



*Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit.  
Bezuidenhoutseweg 73, 2594 AC Den Haag Tel. 070-3786868*

Projectnummer: 32 620 287 00

**Plant Research International  
Onderzoeksgroep Paddenstoelen**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 - 47 83 00  
Fax : 0317 - 47 83 01  
E-mail : [info.paddenstoelen@wur.nl](mailto:info.paddenstoelen@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	5
1.1 sector	5
1.2 productiesysteem	5
1.3 te bereiken projectresultaten	6
2 MATERIAAL EN METHODE	6
3 KENMERKEN EN MOGELIJKHEDEN HUIDIGE TEELTSYSTEEM	7
3.1 Fase-I	7
3.2 Fase-II	7
3.3 Fase-III	8
3.4 dekaarde ingroei en knopvorming	8
3.5 teelt, bijvoeden en vochtvoorziening	9
4 BESCHIKBARE KENNIS VOEDING EN GROEI	10
4.1 labmodel voor teelt	10
4.2 opname van voedingsstoffen en water	11
4.3 morfologie, anatomie, cytologie	12
4.4 moleculair	13
5 IDEEËN EN KENNIS UIT ANDERE SECTOREN	14
5.1 systemen voor plantaardige productie	14
5.2 systemen voor micro-organismen	15
5.3 andere paddenstoelen dan de champignon	17
6 DISCUSSIE EN CONCLUSIES	19
6.1 een nieuw of een gerationaliseerd / geoptimaliseerd teeltsysteem	19
6.2 noodzakelijke aanpak en mogelijkheden	20
REFERENTIES	22

# Samenvatting

In de champignonsector bestaat een grote behoefte aan het belangrijk verhogen van de betrouwbaarheid van het teeltsysteem; ook wordt de wens geuit naar een volledige nieuw systeem, zoals voor de teelt van planten met een voedingsoplossing. Uitgaande van de laatste wens werd een desk-studie uitgevoerd naar de beschikbare kennis om zo een nieuw systeem te ontwikkelen. Er bestaat uitgebreide kennis op het gebied van voeding en productiesysteem van planten, schimmels en bacteriën die wegwijzend kan zijn voor de champignonteelt. Om zowel een belangrijke verbetering van het huidige teeltsysteem te realiseren als om een teeltsysteem met een drager en een voedingsoplossing te realiseren is een laboratoriummodel nodig waarin voeding en groei onder gecontroleerde omstandigheden onderzocht kan worden. Daarom is de ontwikkeling van een dergelijk model de eerste noodzakelijke stap die gedaan dient te worden. De werkzaamheid van het model is direct richtinggevend voor voedingsonderzoek in het huidige systeem en het is direct een eerste generatie systeem voor teelt met drager en voedingsoplossing.

# 1 Inleiding

## 1.1 sector

Het voortbestaan van de Nederlandse champignonsector staat onder grote druk. De economische resultaten in de paddenstoelenteelt zijn de afgelopen jaren zeer slecht geweest o.a. als gevolg van de concurrentie uit Polen. Er lijkt een vorm van herstel/stabilisatie op te treden, maar de structurele problemen van de sector zijn niet opgelost. De sector is intensief bezig een visie te ontwikkelen. Dit blijkt zeer complex te zijn en de visie is nog niet geformuleerd. De sector, substraatproducenten, telers en handel, geven ondertussen eenduidig aan dat verbeteringen en nieuwe richtingen noodzakelijk zijn.

Vanuit de onderzoeksprogrammering van het ministerie van LNV zijn middelen ter beschikking gesteld om een integraal plan op te stellen voor de ontwikkeling van teeltsystemen voor het komende decennium. In dit plan dienen zowel de doorontwikkeling van het huidige systeem, als de ontwikkeling van een volledig nieuw systeem aan de orde te komen. Met deze aanpak zou uiteindelijk ook een hybride systeem kunnen ontstaan. Het plan dient zowel aan te sluiten bij de behoeften van de sector als bij de aandachtspunten van de overheid. Dit maakt het mogelijk om het plan op basis van samenwerking en/of ondersteuning uit te werken.

## 1.2 productiesysteem

Het huidige systeem wordt gekenmerkt door het gebruik van een vaste-stof substraat op basis van lignocellulose (stro en/of strotijke mest). Voor een volledig nieuw systeem wordt ingezet op teelt met voedingsvloeistoffen.

Belangrijke problemen met het huidige systeem zijn:

- de kostprijs van champignons in Nederland is te hoog
- de grenzen van de betrouwbaarheid van het teeltsysteem zijn bereikt. 'Just in time' productie van de gewenste hoeveelheid, sortering en kwaliteit voor de huidige markt is onvoldoende mogelijk.
- de efficiëntie van het grondstofgebruik is laag (de hoeveelheden N, P en C die in het geoogste product aanwezig zijn, zijn minder dan 15 % van de hoeveelheden die aanwezig zijn in doorgroeiende compost (N en P), of zelfs minder dan 10 % (C))
- er is een grote reststroom (N, P, K en CO<sub>2</sub> uitstoot zijn/worden kostbare problemen gezien EU-richtlijnen voor kwaliteit van het grondwater etc)
- de grondstof stro heeft mogelijk een lucratievere toepassing richting biomassa-energie of diervoeding (paardenmest wordt dan grondstof waarvoor betaald moet worden).

Kansen en mogelijkheden:

- verhoging van concurrentiekracht door kwaliteitsverbetering en kostenefficiëntie
- nieuwe marktmogelijkheden met ecologisch meer verantwoord product
- meer doorgroeid substraat per ton stro/mest ingrediënten = verlaging van grondstoffengebruik per eenheid product
- hoger rendement champignons per ton doorgroeid substraat = verlaging van grondstoffengebruik per eenheid product
- verlaging van kostprijs met verbetering van ecologisch rendement
- minder fosfaatinput in substraat, daardoor minder fosfaatafval
- verkleining van afvalstromen (stikstof, fosfaat etc in champost; CO<sub>2</sub>)
- nieuwe technologische kansen: recent onderzoek bij PennState University (Bechara et al 2006) en bij PPO Paddenstoelen (ongepubliceerd) laat zien dat op kunstmatige substraten champignons geproduceerd kunnen worden

- een innovatie vergelijkbaar met die van de overgang van teelt van tomaten in grond naar teelt op steenwol/voedingsoplossing is nu denkbaar voor de champignonsector; mogelijk kunnen hierdoor revolutionaire teeltsystemen mogelijk worden als teelt in kleine units die direct vermarkt kunnen worden (minder pathogenen en besparing op arbeidskosten).

Voorwaarden om kansen en mogelijkheden te benutten:

- er is meer geïntegreerde kennis nodig over groei en ontwikkeling van de champignon. Dit geldt in het bijzonder voor de voeding; door meer inzicht in de voedingsbehoefte, wordt bijvoeding tijdens de teelt naar de actuele behoefte mogelijk (dynamische bijvoeding)
- om tot een teeltsysteem te komen met een hogere benutting van C- en N- en P- (en andere mineralen) voeding dan in het huidige systeem, kan als 'ideaal' genomen worden de ontwikkeling van een systeem met 100 % benutting van de grondstoffen. In plaats van een voedingssubstraat van vaste stoffen zoals stro en mest, valt daarbij te denken aan een hydroponics/aeroponics systeem met recyclebare vaste drager. De kennis die opgedaan wordt bij de ontwikkeling van zo een systeem/prototype kan op verschillende manieren worden toegepast, namelijk bij de verbetering van het huidige systeem, bij de daadwerkelijke ontwikkeling van zo een systeem voor de praktijk en bij de ontwikkeling van een hybride systeem van vaste stof gecombineerd met voedingsvloeistof. Het gebruik van (aanvullende) voedingsvloeistof kan sturing van de voeding mogelijk maken, waardoor de benutting van organische stof en mineralen uit het vaste substraat stijgt
- de haalbaarheid van een stro/mest vrij systeem kan op pilot scale onderzocht worden. Het systeem op pilot scale bestaat uit een experimenteel model waarin de voeding van champignon door variatie en vervanging van voedingscomponenten onderzocht kan worden. In het bestaande systeem is dergelijk onderzoek onmogelijk.
- Uit observationeel onderzoek naar het verloop van voedingscomponenten in het substraat en in vruchtlichamen tijdens uitgroei kunnen deficiënties, limiterende processen en mogelijke inhibitoren opgespoord worden.

### 1.3 te bereiken projectresultaten

- kennisoverzicht ('state of the art' en witte plekken/kennisvragen inventarisatie)
- lange termijn innovatie aanpak

## 2 Materiaal en Methode

Er werd een literatuuronderzoek uitgevoerd. Relevante wetenschappelijke literatuur werd gezocht in databases zoals CAB-Abstracts, Current Contents and Web of Science. Naar aanvullende informatie werd gezocht op internet.

### 3 Kenmerken en mogelijkheden huidige teeltsysteem

Composteren en teelt verlopen volgens onderstaand schema:

	procesruimte	temperatuur, °C	inoculatie	tijdsduur, dagen
mengen grondstoffen	menghal			1
1 fase-I	tunnel	70 – 80 (max)		3 - 10
2 fase-II	tunnel	45	fase-II compost	6
3 fase-III	tunnel	24	champignonbroed	14
4 teelt, dekaarde ingroei	teeltcel	24		10
knopvorming en uitgroei	idem	20		30

De eerste drie processen zijn bulk-processen die in tunnels worden uitgevoerd. In tunnels is een goede procescontrole mogelijk. Voor fase-I en fase-II worden tunnels met een verschillende constructie / uitrusting gebruikt. Tunnels voor fase-II zijn ook voor fase-III geschikt. De metabole processen in de champignonteelt zijn heterotroof waarbij naast CO<sub>2</sub> ook warmte wordt geproduceerd. Deze warmteproductie is van doorslaggevend belang bij de procesgang; de uitrusting en controle is vooral gericht op een gecontroleerde warmteafvoer. Deze afvoer verloopt vooral door het verdampen van water. Door de droge stof afbraak, de warmte productie en de verdamping verandert de verhouding van droge stof en water in het substraat. Dit maakt het composteren complex.

#### 3.1 Fase-I

De hoge temperatuur tijdens fase-I is nodig voor een 'ontsluiting' van het (plantaardige) celwandmateriaal in de grondstoffen. Na fase-I moet het materiaal goed vocht kunnen vasthouden en moet de structuur enerzijds een goede compressie van het substraat mogelijk maken en anderzijds moet porositeit overblijven voor gasuitwisseling. De betekenis van microstructurele en biochemische veranderingen in het celwandmateriaal als voorwaarde voor de toegang tot dit materiaal van de champignonschimmel en zijn extracellulaire enzymen is onduidelijk.

Voor de teelt is fase-I geen absolute voorwaarde. Uitsluitend een fase-II proces met mest, stro, gips en water, eventueel aangevuld met een kleine hoeveelheid fase-II compost als inoculum, kan tot een goede opbrengst aan champignons, uitgedrukt in kg champignons per ton fase-III compost, leiden (Gerrits 1997; door de lage bulkdichtheid kan minder compost gevuld worden in het teeltbed en is de opbrengst uitgedrukt in kg champignons per m<sup>2</sup> teeltoppervlak relatief laag). Voorwaarde is dat in de fase-III compost het vocht en stikstofgehalte optimaal zijn. Het realiseren van dit laatste is niet op directe manier te bereiken. Naast de samenstelling van het mengsel waarmee fase-II begonnen wordt is de procesgang tijdens fase-II van invloed. Mocht het toegevoegde vocht niet voldoende opgenomen worden door het mengsel, dan kan ongecontroleerd vochtverlies, percolatie, optreden wat gevolgen heeft voor het vochtgehalte van de compost, maar ook op het stikstofgehalte van de compost. Dit blijkt zelfs bij composten die een fase-I proces hebben ondergaan op te kunnen treden (Straatsma et al 2004). Een te laag vochtgehalte kan leiden tot compost die niet voldoende vrij raakt van ammoniak en niet voldoende 'selectief' is (Gerrits & Amsing 1997).

#### 3.2 Fase-II

Na fase-II moet de compost 'selectief' zijn voor de champignonschimmel. Het geïnoculeerde champignonbroed moet goed kunnen uitgroeien en concurrerende en ziekteverwekkende organismen moeten afwezig zijn of in ieder geval geen kans krijgen. Selectiviteit berust vooral op de aanwezigheid van de thermofiele schimmel *Scytalidium thermophilum* die zich tijdens fase-II ontwikkelt (Straatsma et al 1989, 1995) en op de afwezigheid van een ruikbare hoeveelheid ammoniak. *Scytalidium* komt algemeen voor, oa

in de compostgrondstoffen, maar de aanwezigheid in de compost na fase-I met zijn hoge temperatuur is niet gegarandeerd. Daarom wordt dit materiaal voor het begin van fase-II bijgeënt met materiaal dat fase-II al doorlopen heeft en dus *Scytalidium* bevat. Op welk mechanisme de selectiviteit door *Scytalidium* berust is nog altijd onbekend. Groei van champignonmycelium is ook zonder *Scytalidium* mogelijk. Zo is al lang bekend dat niet gecomposteerde grondstoffenmengsels die geautoclaveerd zijn in principe te gebruiken zijn als substraat voor succesvolle teelt (Till 1962, Huhnke & von Sengbusch 1969). In meer recente tijd zijn teelt systemen ontwikkeld op basis van 'hoge temperatuur pasteurisatie' (Laborde 1995) en op basis van waterstofperoxide ontsmetting (Wayne 2001). Op grote schaal zijn deze methoden echter niet doorgebroken. Waarom dit niet is gebeurd is onduidelijk: betrouwbaarheid/reproduceerbaarheid, technologische problemen/onzekerheden, geschatte investeringen wegen niet op tegen voordelen?

### 3.3 Fase-III

Fase-III start met de inoculatie van champignonmycelium. Dit inoculum wordt op industriële schaal gemaakt en bestaat uit gesteriliseerd graan dat doorgroeit met champignonmycelium. De 'inoculum potentiaal' van het broed speelt een rol bij de uitgroei van het mycelium. Kleine broedkorrels die kort na inoculatie, twee tot drie dagen, over hun hele oppervlakte pluizend mycelium laten zien groeien niet perse uit tot regelmatig gevormde, bolvormige, kolonietjes van champignonmycelium. Na de start van de uitgroei kan de groei van een deel van de kolonie tot stilstand komen. Meerdere korrels opeengepakt groeien wel uit tot regelmatig gevormde kolonies. Individuele, kleine deeltjes doorgroeide compost of inocula uit agarplaten laten enig pluiz/groei zien, maar dit is erg beperkt en kolonisatie van compost met dergelijk inoculum komt niet tot stand. Als individuele kolonies vanuit broedkorrels elkaar raken, na acht of negen dagen, ontstaat een samenhangend mycelium, waarschijnlijk door anastomoses (cellfusie van hyfen). Pas op dit moment blijkt het mycelium in staat te zijn om de dekaarde te koloniseren (Straatsma 1991).

Bij het legen van de tunnel na Fase-III wordt de samenhang van het mycelium in de compost verstoord, een samenhang die pas weer wordt hersteld na het vullen en bijvoeden in een teeltcel. Omdat het champignonmycelium zich snel herstelt, kan de compost in een relatief goedkoop bulk proces doorgroeit worden met mycelium en kunnen er na de doorgroei nog (vaste) stoffen aan het substraat toegevoegd worden. Dit gebeurt met zogenaamde bijvoedmiddelen, eiwitrijke stoffen die de uiteindelijke champignonopbrengst verhogen, vooral als de compost een suboptimale hoeveelheid stikstof bevat. Hoewel er voor de champignon geen schadelijke effecten van de verstoring van de myceliumsamenhang bekend zijn treedt er echter bij de oesterzwam wel schade op.

### 3.4 dekaarde ingroei en knopvorming

Champignons kunnen zich niet direct op het voedingsubstraat vormen. Het voedingsubstraat moet worden afgedekt met dekaarde dat een veel lager zoutgehalte dient te hebben dan compost en dat micro-organismen moet bevatten die de champignonvorming stimuleren. Dekaaarde bevat veel veen; veen is geen specifieke voorwaarde voor vruchtlichaamvorming maar wordt gebruikt om zijn water vasthoudend vermogen. Naast voldoende stikstof in het voedingsubstraat is een goede vochtvoorziening van groot belang voor een optimale opbrengst aan champignons.

Pas als er een samenhang ontstaan is in het mycelium in de compost, begint het mycelium de laag dekaarde te koloniseren (Straatsma et al 1991). In de dekaarde ontstaat een groot aantal primordia en de primordiovorming wordt afgesloten voordat de uitgroei van vruchtlichamen begint (Flegg 1978). Straatsma (2005) gaf aan dat het geproduceerde aantal primordia ongeveer 60 000 per m<sup>2</sup> was. Dit aantal was ongeveer 50 maal groter dan het aantal champignons dat in de eerste vlucht ontstond (Fig 1). Het is onbekend wat de vorming van primordia 'kost' en of de vorming van een overdaad ten koste gaat van de uiteindelijke opbrengst aan champignons of anderszins leidt tot inefficiënt substraat gebruik.



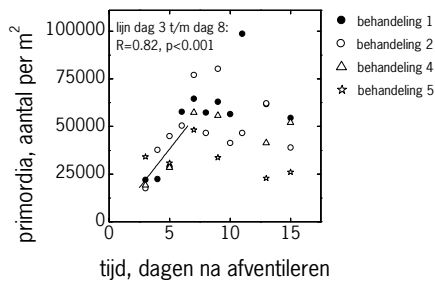


Fig 1. Ontwikkeling van het aantal primordia in de dekaarde vanaf het afventileren. Tussen dag 3 en dag 8 leek het aantal primordia op een regelmatige manier toe te nemen in de tijd; door de meetwaarden in deze periode werd de best passende recht lijn getrokken. (Straatsma 2005).

Met time laps opnamen van het dekaarde oppervlakte werd de periode van knopvorming in detail bekeken (Straatsma & Van Loon 2007). Op het tijdstip rond het afventileren komt de uitbreiding van het mycelium over het dekaarde oppervlakte tot stilstand. Daarna wordt het gekoloniseerde oppervlakte intenser wit, maar de grootte van het doorgroeide oppervlakte neemt niet (meer) toe. Dit wijst op het ontstaan van samenhang van mycelium in de dekaarde. Vervolgens wordt de primordiovorming aan het oppervlakte zichtbaar. Her en der, op verschillende tijdstippen, ontstaan plekjes waar deze primordia vervolgens gaan groeien, maar deze groei zet (nog) niet door. Op een bepaald moment gaan alle plekjes die groei lieten zien zich doorontwikkelen en aansluitend ontstaan knoppen en champignons van de eerste vlucht. De ontwikkeling en uitgroei van primordia en vruchtlichamen op een beperkt aantal plekken lijkt een “communicatie” te vereisen en onderstreept de samenhang in het mycelium; een door het mycelium ‘toegestane’ uitgroei. De opeenvolging van ontwikkelingsstapjes kunnen wellicht beïnvloed worden door teeltmaatregelen zoals manier van afventileren, en eventuele correcties daarop (sproeien, tijdelijke temperatuurverhoging). Welke mechanismen deze ontwikkelingen initiëren en regelen is niet precies bekend. Het is dus ook niet mogelijk om dit uiterst belangrijk moment in de teelt volledig te regelen.

fase	...	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
	tijd, dagen																	
				●									●					
				afventileren									maximum aantal primordia bereikt					
												●					●	
												eerste 10 mm knoppen					oogstdag	
a	<i>samenhang, uitbreiding mycelium over dekaarde komt tot staan</i>																	
b	<i>mycelium wordt intenser wit</i>																	
c	<i>bewegingen aan dekaarde-oppervlakte</i>																	
d	<i>gecoördineerde bewegingen, knopuitgroei</i>																	

Fig 2. Schema van verschillende stappen in de fase van vruchtlichaamvorming.

### 3.5 teelt, bijvoeden en vochtvoorziening

Het stikstof en het vochtgehalte van compost zijn bepalend voor de opbrengst aan champignons (Gerrits 1989, Amsing & Gerrits 1991); de optima liggen bij 2.2 % van de droge stof en bij 67 % van het totaal gewicht, respectievelijk.

Gerrits & Amsing (1994) lieten zien dat de opbrengstverhoging die met bijvoeden werd bereikt (doorgroeide compost bijgevoed met 1 kg formaline behandeld sojabonenmeel per m² teeltoppervlakte) afhangt van het stikstofgehalte van doorgroeide compost. Op stikstofarme composten werden grote positieve effecten van bijvoeden vastgesteld; maar ook bij supra-optimale N-gehalten is een (gering) positief met bijvoeden te bereiken. Dit wijst erop dat de stikstofhoudende stof die door de champignon benut wordt niet optimaal

beschikbaar is. Op te stikstofrijke compost en bij bijvoeden van stikstofrijke compost kunnen echter problemen ontstaan. Het mycelium wordt te 'actief' en de temperatuur in de compost kan onvoldoende gecontroleerd worden.

Recent is de vochtvoorziening van de champignon, met de knelpunten daarin, besproken (Straatsma & Amsing 2005).

Relevant in het teeltsysteem is het procesverloop en de regeling daarvan. Kenmerkend zijn de afbraak van droge stof met daaraan gekoppeld de productie van CO<sub>2</sub> en warmte. In het algemeen geldt dat voor een optimale procesgang de omstandigheden zoveel mogelijk 'constant' dienen te blijven. In de teelt wordt daarom geventileerd met (geconditioneerde) lucht die CO<sub>2</sub> en warmte afvoert; warmte vooral door verdamping van water ('ventilative heat management'). Aan warmte productie, 'activiteit', en verdamping wordt een grote betekenis toegekend in de praktijk. Het is onvoldoende duidelijk wat die betekenis is (zie ook Straatsma & Amsing 2005) omdat er geen (model) teeltsysteem is om de verschillende deelprocessen onafhankelijk van elkaar te controleren en te onderzoeken.

## 4 Beschikbare kennis voeding en groei

### 4.1 labmodel voor teelt

Myceliumgroei, knopvorming en uitgroei van champignons zijn mogelijk op voedingssubstraten bestaande uit gekookt graan en ook op een inerte drager met een voedingsoplossing (San Antonio 1971, Castle et al 1988, Aksu & Gunay 1999, Bechara et al 2004, 2006a, b, Straatsma & Olijnsma mededeling). Enkele karakteristieken van de proeven en resultaten van Bechara et al (2004, 2006) worden weergegeven in Tabel 1.

systemen, perliet als drager		
doorvoeren, rondpompen	doorvoeren, afvoeren	zonder door- of afvoer
twee voedingsoplossingen	twee voedingsoplossingen EN gedeïoniseerd water	dextrine oplossingen niveaus dextrine/caseïne
700 ml per container	700 ml (?)	1000 ml
rondpompen 2x per dag	verversing 'on alternate days' 4 minuten verblijf dan afvoer	
opbrengsten, g		
	(pH controle CaCO <sub>3</sub> )	
'sucrose' 9.7	'sucrose' 92.0	'dextrin' 10 106.0
'dextrin' 39.0	gedeïoniseerd water 53.0	'dextrin' 30 142.0
	(+antimicrobial compounds)	'dextrin' 50 115.0
	'sucrose' 85.0	
	'dextrin' 109.0	
	'dextrin' (perliet + veen) 101.0	
	gedeïoniseerd water 72.0	
	(groei op aanwezig broed)	

Tabel 1. Opbrengstgegevens van Bechara et al (2004, 2006) in systemen met voedingsvloeistoffen en perliet als drager ('controle' systeem met een eenmalige toediening van vloeistof voor de teelt, 'kolom' 3; systeem waarin de toegevoegde vloeistof wordt rondgepompt/gerecirculeerd, 'kolom' 1; en systeem waarin om de dag de oude vloeistof wordt afgevoerd en nieuwe wordt toegediend, 'kolom' 2; binnen kolommen worden effecten van verschillende voedingsstoffen, sucrose, dextrine en controle-water, geen koolstof in de oplossing- zichtbaar).

De ongepubliceerde resultaten van Straatsma & Olijnsma lieten zien dat mycelium in/op een inerte drager met een voedingsoplossing reproduceerbaar champignons kan ontwikkelen. Tot nu toe bestond de voedingsoplossing uit natuurlijke extracten en de chemische samenstelling daarvan is slechts gedeeltelijk bekend. Het ontwikkelen van een chemisch gedefinieerde voedingsoplossing biedt de mogelijkheid om relatief snel inzicht in de voedingsbehoefte van een schimmel te krijgen (Treschow 1944, Dijkstra et al

1972, Dütsch 1978, Straatsma & Van Griensven 1986, Straatsma et al 1993).

In principe eenvoudig te bestuderen is de groei van geoogste champignons, hetzij champignons met een 'voetje' (volledig intacte steel) of afgesneden champignons (doorgesneden steel) (Kritskii et al 1965, Rast 1966, Gooday 1974, Cox & Niederpruem 1975, Hammond & Nichols 1975, Turner 1977). Als de champignon in een oplossing met voedingsstoffen wordt gezet, is er echter niet noodzakelijkerwijs sprake van normale groei. Het kan ook om 'post harvest' ontwikkeling gaan. Champignons kunnen na operaties zoals het wegsnijden van een groot deel van de hoed, blijven doorgroeien (Gruen 1963). Door middel van dergelijke operaties werd vastgesteld dat de aanwezigheid van lamellen noodzakelijk is voor een goede groei van zowel steel als hoed. Knoppen van champignons die worden geplukt en teruggezet (transplanteren) kunnen een nieuwe verbinding met het mycelium in de dekaarde maken en daarna normaal uitgroeien (Sinden et al 1962). Dit geldt voor knoppen met een minimale grootte van 10 mm; kleine primordia aan strengen lieten zich niet met succes transplanteren (Straatsma & Olijnsma mededeling).

Wat betreft knopvorming op gesteriliseerd dekmateriaal kan toevoeging van actieve kool de aanwezigheid van een geschikte 'microflora' in de dekaarde vervangen (Eger 1961, Noble et al 2003, Straatsma & Olijnsma mededeling). De verschillende benaderingen zijn (nog) niet geïntegreerd in een laboratoriummodel. Voor de champignon bestaat er geen eenvoudig inzetbaar laboratorium teeltmethode waarbij steriele omstandigheden gehandhaafd kunnen blijven en waarmee reproduceerbare opbrengsten behaald kunnen worden.

## 4.2 opname van voedingsstoffen en water

Straatsma & Amsing (2005) schreven in een literatuurrapport over opname (citaat): 'Voedingsstoffen worden in opgeloste vorm opgenomen, 'actief' in de celinhoud van hyfen. De opname van water verloopt 'passief' door osmose, een fysisch proces. Niet alle voedingsstoffen komen in opgeloste vorm voor in het substraat. Het grootste deel van de koolstof is in gebonden vorm aanwezig als cellulose en andere polymeren, macromoleculen. Alleen de afbraakproducten van macromoleculen kunnen in oplossing gaan en opgenomen worden door mycelium. De opneembaarheid van mineralen verschilt per mineraal; stikstof komt in meerdere, al dan niet gebonden vormen voor, fosfaat komt vooral in gebonden vorm aan calcium voor, kalium komt bijna geheel in opneembare vorm voor (Straatsma mededeling). Het mycelium maakt een aantal gebonden voedingsstoffen beschikbaar voor opname. Het beschikbaar maken gebeurt door de uitscheiding van enzymen zoals cellulase voor het beschikbaar maken van opneembaar glucose (en cellobiose?) uit cellulose (Turner et al 1975, Wood & Goodenough 1977), proteïnase voor het beschikbaar maken van opneembare aminozuren en ammoniumstikstof uit eiwit en uit stikstof gebonden aan lignocellulose en zuurfosfatase voor het beschikbaar maken van opneembaar fosfaat uit gebonden fosfaat. Naast de uitscheiding van enzymen is ook de uitscheiding door het mycelium van organische zuren belangrijk. Daardoor wordt de pH van de omgeving van het mycelium beïnvloed en kan de beschikbaarheid van een aantal stoffen toenemen. Het voorkomen van voedingsstoffen in opgeloste vorm is niet de enige voorwaarde voor opname. De opgeloste stoffen kunnen alleen in direct contact met mycelium opgenomen worden; in een vast substraat is er, over heel kleine afstanden, transport nodig naar mycelium. Ook de door het mycelium uitgescheiden stoffen moeten getransporteerd worden, namelijk naar de plaats waar gebonden vormen van voedingsstoffen voorkomen om ze daar in beschikbare vorm te brengen (zie ook Daniel et al 2004, Horn et al 2006). De transportvormen die voor kunnen komen zijn stroming en diffusie. Deze vormen worden onderscheiden in analogie aan het transport van voedingsstoffen in de bodem naar plantenwortels. Tijdens de teelt wordt meer organische stof afgebroken en afgevoerd dan dat er mineralen worden afgevoerd. Hierdoor treedt een relatieve ophoping van mineralen in het substraat op. Samen met wateronttrekking leidt dit tot een stijging van de osmotische waarde, een verlaging van de osmotische potentiaal. Met name de bovenlaag van de compost verliest tijdens de ontwikkeling van een vlucht veel water en droge stof.' Het is denkbaar dat de stijging van de osmotische waarde van de compost door een beperkte mate van uitspoelen van de compost kan worden tegengegaan en dat dit tot een betere benutting van het substraat en tot een stijging van de champignonopbrengst leidt.

'Van champignons is bekend dat bij de voeding met koolstof de stoffen trehalose en het osmotisch actieve mannitol belangrijk zijn. De koolstof die uit de compost wordt vrijgemaakt wordt opgenomen door het

mycelium en in het mycelium omgezet tot trehalose. Trehalose is een dimeer dat veel in schimmels voorkomt. In vruchtlichamen komt weinig trehalose voor maar veel mannitol, een monomeer. Per deeltje trehalose kunnen twee deeltjes mannitol gevormd worden via enzymatische omzettingen. Door de splitsing van trehalose in twee deeltjes mannitol neemt de osmotische waarde van de vloeistof waarin de omzetting plaats vindt toe. De mannitol concentratie in champignons neemt toe tijdens hun ontwikkeling tot een gehalte van 50% van de droge stof. Als een oplossing gezien, komen de opgegeven waarden neer op een concentratie van ongeveer 200 mM.' (zie ook Molloy 2004). Deze toename in osmotische waarde is de drijvende kracht voor water- en dus voedingstransport vanuit het mycelium in de compost naar de champignons.

Het is onbekend of opname sterk afhankelijk is van de hoeveelheid aanwezig mycelium en of dit mycelium zich voor opname in een bijzondere leeftijd of ontwikkeling moet bevinden.

### 4.3 morfologie, anatomie, cytologie

Straatsma & Amsing (2005) beschreven het belang van strengen voor het transport van vocht en voedingsstoffen. Een (vrij) citaat: 'hyfen in de compost nemen koolstof en andere stoffen op in de levende cel inhoud van de hyfen. Vervolgens worden de stoffen getransporteerd naar een vat van 'vessel hyphae'. Deze 'vessel hyphae' zijn ontstaan uit parallel aan elkaar liggende schimmelcellen waarvan de contactwanden zijn opgelost en waarvan de levende inhoud, het cytoplasma, verdwenen is. Deze vaten kunnen als capillairen beschouwd worden. Aan het andere einde van het vat worden de stoffen weer opgenomen in de levende celinhoud, bijvoorbeeld van hyfen die tot een uitgroeiende champignon behoren.'

Umar & Van Griensven (1998) onderzochten het ontstaan van strengen. De nog niet gespecialiseerde hyfen waaruit een streng ontstaat bestaan uit hydrofobe, waterafstotende, hyfen met calciumoxalaat kristallen op hun oppervlak. Dergelijke hyfen werden 'fluffy white hyphae' genoemd. Aan de hyfen ontstaan kleine bolletjes, waarschijnlijk dode cellen, die 'blue bodies' genoemd werden. Deze bolletjes bestaan uit een materiaal waardoor hyfen aan elkaar plakken, hun calciumoxalaat kristallen verliezen en samengroeien tot een streng. Het plakkende materiaal werd 'extracellular matrix' genoemd. De streng blijft omgeven door niet gespecialiseerde, waterafstotende hyfen. Het inwendige van de streng bestaat uit hyfen die geen water afstoten. Walser et al. (2003) gaan in op de samenstelling van het plakkende materiaal, de 'extracellular matrix'.

Reijnders (1977), Kues & Liu (2000) en Moore (2005) bespraken de vorming van paddenstoelen. Belangrijk is de vorming, vanuit een streng, van een 'hyphal knot'. Bij champignons gaat het, om wat in de praktijk genoemd wordt, een 'samentrekking'. Heckman et al (1989) zagen centraal in de samentrekking van de champignon gekromde hyfen, hyfen waaraan Kues & Liu (2000) en Moore (2005) een centrale betekenis hechten ('homing': Glass et al. 2004). Sanchez et al (2006) beschrijven dit in detail voor *Pleurotus pulmonarius*.

Voor transport spelen de overgang van strengen naar steel, de steel zelf en de overgang van steel naar hoedweefsel een rol. Umar & Van Griensven (1997) laten details zien van de overgang van steel- naar hoedweefsel (Fig 3). Deze overgangsplaats ziet er in een doorsnede altijd 'vochtig' uit. Juist in dit gebied ontstaan 'degeneratieve' holtes. Deze holtevorming is één van de duidelijkste aspecten van het ouder worden van champignons. Blijkbaar is de overgang van steel naar hoed een 'zwakke' plek in de bouw van champignons. Wij stellen ons voor dat op deze plek transportproblemen kunnen ontstaan, zoals vochtophoping bij 'waterstelen' (Amsing et al 2002).

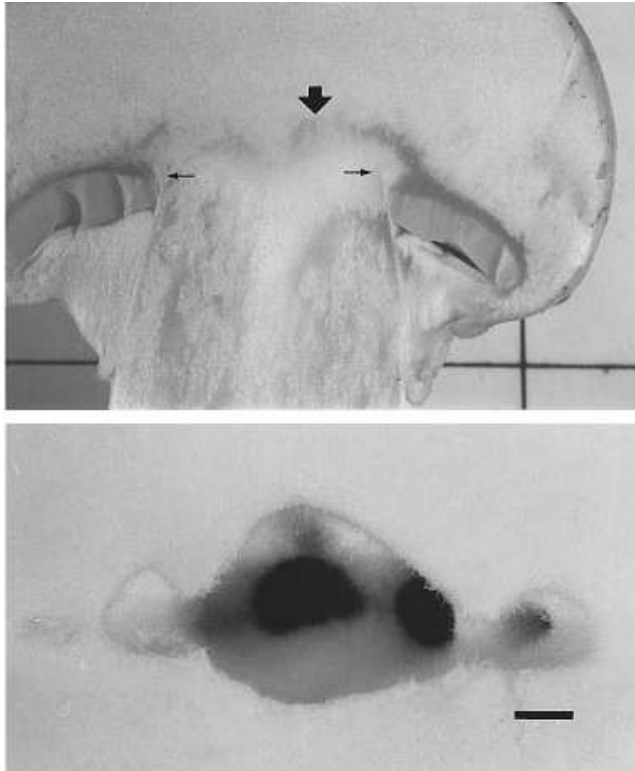


Fig 3 (Umar & Van Griensven 1997, fig 16 en 17). Holtevorming in de overgangsplaat van steel naar hoed. In de bovenste figuur is een vruchtlichaam met een hoeddiameter van 46 mm te zien. Het centrale deel van de steel is opvallend wit. De dunne pijltjes wijzen naar de nog gesloten ruimte waarin de lamellen zicht ontwikkelen. Tussen deze ruimtes is een gegolfde laag zichtbaar die met een dik pijltje wordt aangegeven; dit is de altijd zichtbare overgangsplaat tussen steel en hoed. In de onderste figuur is sterke holtevorming te zien in een 8 dagen oud vruchtlichaam; schaalstreepje 2 mm.

## 4.4 moleculair

Ontwikkelingsprocessen van schimmels, zoals de vorming van vruchtlichamen, bestaan uit een keten of een netwerk van moleculaire gebeurtenissen met een grote rol voor de erfelijke eigenschappen van de schimmel: 'De mogelijkheid om van morfologische vorm te veranderen .... wordt staat vooral onder controle van veranderingen in transcriptie en kan in gang worden gezet door verschillende omgevingsomstandigheden. Deze omstandigheden worden omgezet in een verandering in morfologie door een netwerk van signaalverwerkende routes waarvan de activiteit gecoördineerd wordt door transcriptie regulatoren' (Nickerson et al 2006, over *Candida albicans*). Bij *Flammulina velutipes*, het fluweelpootje, analyseerden Yamada et al (2006) genproducten die specifiek zijn voor de vruchtlichaamvorming. Deze genproducten werden betrokken geacht bij de signaal transductie, groeifactorgelijkend eiwit, ubiquitin-protasome route, cytochrome en hydrofobinen: 'In de praktijk wordt vruchtlichaamvorming in gang gebracht door de beïnvloeding van omgevingsfactoren zoals temperatuur, licht, vochtigheid, eventueel in combinatie met fysische of chemische prikkels. Deze factoren stimuleren de expressie van (een) regelgen(en) die tot genactiviteit leidt nodig voor vruchtlichaamvorming. De analyse van specifieke genexpressie bij de start van de vruchtlichaamvorming kan leiden tot een beter begrip van het mechanisme van vruchtlichaamvorming op moleculair niveau en zou dienstbaar kunnen zijn bij de ontwikkeling van (een) teeltsyste(e)m(en) voor verschillende commercieel interessante paddenstoelen.' Het inzicht in de samenhang van processen betrokken bij een ontwikkeling kan vergroot worden door modelvorming van cellulaire processen ('genome-scale metabolic model', Price et al 2004, Bruggeman & Westerhoff 2006, Teusink et al 2006). Het afbraakproces van lignocellulose, dat een voorwaarde is voor een succesvolle vruchtlichaamontwikkeling op lignocellulose houdend substraat, is net als het ontwikkelingsproces ook complex (Steffen et al 2000, Aro et al 2005) en kan wellicht ook gemodelleerd worden. Misschien dat pas met goede modellen duidelijk wordt waar precies de mogelijkheden tot beïnvloeding/sturing liggen.

Tot de omgevingsfactoren die een rol spelen bij een ontwikkeling of functie hoort de manier van myceliumkweek. De enzymproductie van *Aspergillus* soorten kan duidelijk hoger zijn bij een vaste stofferfermentatie (solid state culture, SSF) dan in vloeistofkweek (Oda et al 2006). Hechting aan een oppervlakte en het ontstaan van een 'biofilm' kan daarbij belangrijk zijn (Villena & Gutierrez-Correa 2006).

Processen van ontwikkeling en van substraatafbraak/opname kunnen op specifieke plaatsen voorkomen in hyfen, mycelium, weefsels of organen. Dit wordt aangeduid met de term 'differential expression' (Vinck et al 2005, Masai et al 2006, Takano et al 2006). Ook bij de champignon is 'differential expression' bekend bij de substraatafbraak en de vruchtlichaamontwikkeling. Al relatief lang is bekend dat in de myceliumgroeifase, bij het achterwege blijven van vruchtlichaamvorming, het mycelium in de compost 'lignine' afbreekt. Pas als er vruchtlichamen ontstaan en uitgroeien wordt 'cellulose' afgebroken (Gerrits et al 1967, Gerrits 1969). Bij de afbraak van lignine en cellulose spelen respectievelijk de enzymen laccase en cellulase een belangrijke rol. Het voorkomen van deze enzymen is sterk gekoppeld met de twee afbraakprocessen (Turner et al 1975, Wood & Goodenough 1977). Moleculair onderzoek aan de champignon vordert gestaag (de Groot et al 1997, Ten Have et al 2003, Morales & Thuston 2003, Wagemaker et al 2006). Ten Have et al (2003 en mededeling) vonden naast een toename van cellulase ook een toename van acetylxyylan esterase en cutinase in het substraat bij de uitgroeï van champignons. Voortgang bij de moleculaire kennis is echter sterk afhankelijk van de voortgang bij andere eetbare paddenstoelen (Whiteford & Thurston 2000), zoals bij *Pleurotus* en bij *Lentinula*, en bij schimmels in het algemeen (Pel et al 2007). Op dit moment loopt er een STW project bij de Universiteit Utrecht 'Master switches of initiation of mushroom formation', projectleider Prof.dr. H.A.B. Wösten. In dit project wordt gezocht naar de allereerste schakels (genen) in het proces van vruchtlichaamvorming en welke externe factoren invloed hebben op de expressie van deze genen. Op deze manier kan de vorming van knoppen "beheerst" worden.

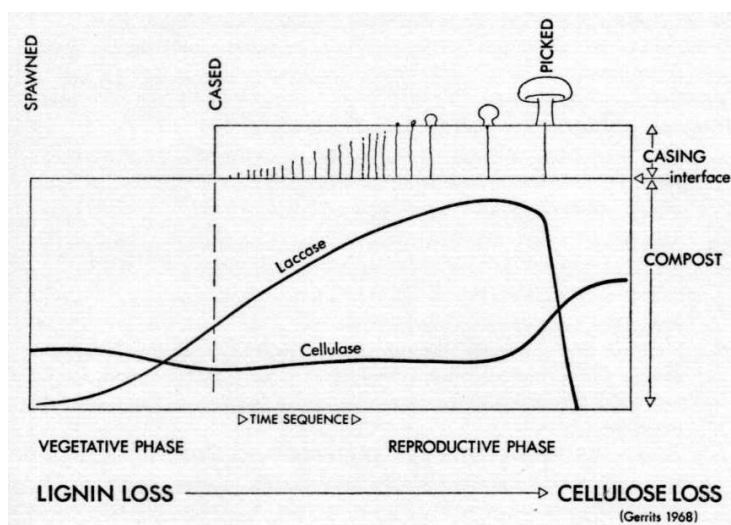


Fig 4. Mycelium in compost produceert het enzym laccase tot aan het moment dat een vlucht (hier, in een figuur overgenomen van Turner, de eerste vlucht) begint uit te groeien. Als de vlucht uitgroeit is er relatief veel koolstof nodig voor de groeiende champignons. De laccase activiteit zakt in, daarvoor in de plaats ontstaat een cellulase activiteit.

## 5 Ideeën en kennis uit andere sectoren

### 5.1 systemen voor plantaardige productie

Teelt van planten op een voedingsoplossing gaat ver terug in de geschiedenis. De 'hangende tuinen van

Babel' zouden een dergelijk systeem zijn geweest. In de pre-Columbiaanse tijd teelden Azteken rond 'Mexico stad' groenten en bloemen op drijvende eilandjes in een meer (chinampas). In de 19<sup>e</sup> eeuw ontstond inzicht in de minerale voeding van planten door onderzoek met oplossingen (Julius von Sachs en Wilhelm Knop, in Steiner 1985; 'Knop-oplossing'). In de 20<sup>e</sup> eeuw ontstond inzicht in metabolisme van planten door 'in vitro' onderzoek met plantenorganen, weefsels en cellen ('weefselkweek'). Het is mogelijk om, los van de plant, vruchten van tomaat en druif te laten groeien (Nitsch 1951, Ishida 1991, Perez et al 2000). Ook is het mogelijk om 'in vitro' gekweekte plantencellen en plantenorganen in korrels, een 'kunstmatig zaad' op te slaan voor later gebruik (Patel et al 2000, Nyende et al 2003). In de biotechnologie worden velerlei bioreactoren ontworpen voor de teelt van microbiële, plantaardige en dierlijke cellen (bijvoorbeeld Souret et al 2003, Ziv 2005 en Suresh et al 2005). Ook in de productie van (melk)eiwit zijn er innovatieve ontwikkelingen (Bruce 2004, Wu et al 2004, Lonnerdal 2002).

## 5.2 systemen voor micro-organismen

Een aantal producten voor menselijke en dierlijke consumptie worden biotechnologisch gemaakt zoals gist, alcohol en sojafermenten. Sinds een aantal decennia wordt aan microbiële eiwitproductie gewerkt (single cell protein, SCP: 'microbial biomass or proteins extracted therefrom obtained from processes in which bacteria, yeasts, other fungi or algae are cultivated in large quantities as human or animal protein supplement in animal feed or in human nutrition; Anupama & Ravindra, 2000). Dit heeft tot vleesvervangers zoals 'Quorn' geleid (Wiebe 2002, <http://www.mycoproteineducation.com/foodproduction/ferm/quornprod.php>, Sadler, 2004) en tot producten voor diervoeding (Anupama & Ravindra 2000, Villas-Boas et al 2002) zoals 'Bioprotein' (maar zie bijwerkingen bij productie en toepassing: Sikkeland et al 2007; zie ook mogelijke bijwerking bij Quorn: Jacobson 2003).

Planten met symbiotische mycorrhizaschimmels op hun wortels kunnen met een voedingsoplossing gekweekt worden (Mosse & Thompson 1984, Nylund & Wallander 1989, Kamminga - van Wijk et al 1992, Lee & George 2005).

Zowel compostproductie als teelt van champignons zijn in wezen vaste-stoffermentaties, 'solid state fermentation', SSF (Krishna 2005). Mitchell et al (2006) geven verschillende systemen schematisch weer (Fig 5). Tunnels die in de champignonteelt gebruikt worden voor de substraatproductie behoren tot 'group II, packed bed' reactoren. Teeltcellen met bedden in stellingen behoren tot 'group I, tray chamber' reactoren.

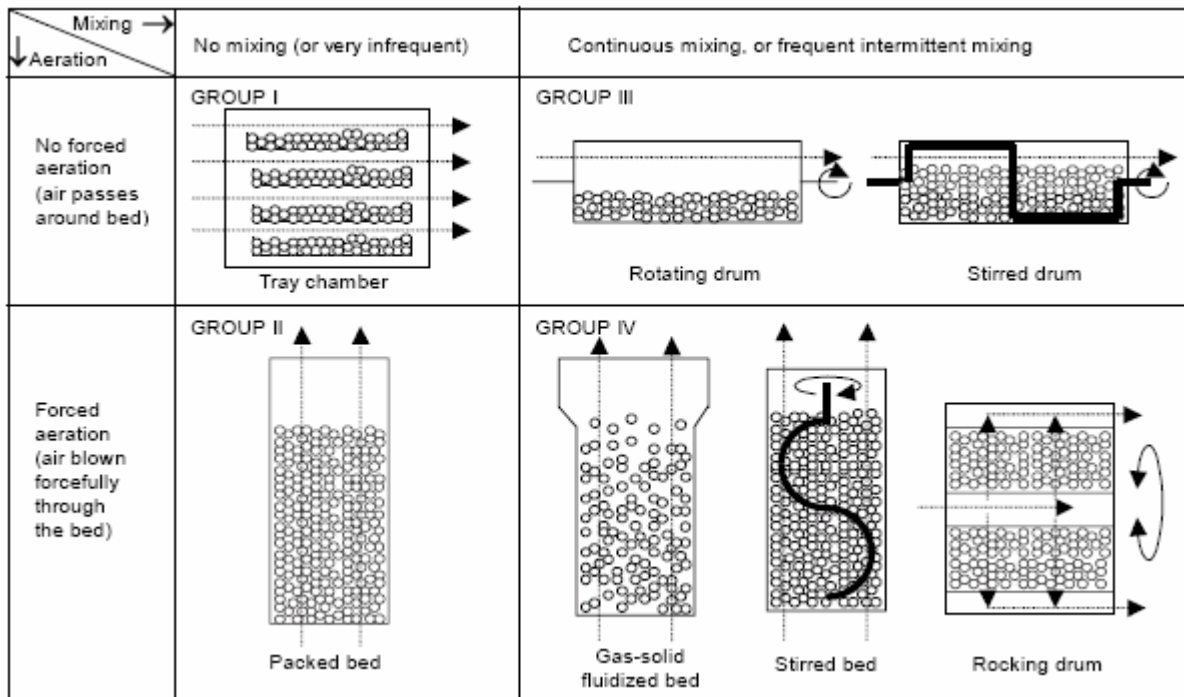


Fig 5; overgenomen uit Mitchel et al (2006). 'Basic design features of the various SSF bioreactors, showing how they can be classified into four groups on the basis of how they are mixed and aerated.'

Vaste stof fermentatie wordt gekenmerkt door een relatief groot aantal processen. Hoelker & Lenz (2005) hebben dat schematisch weergegeven (Fig 6)

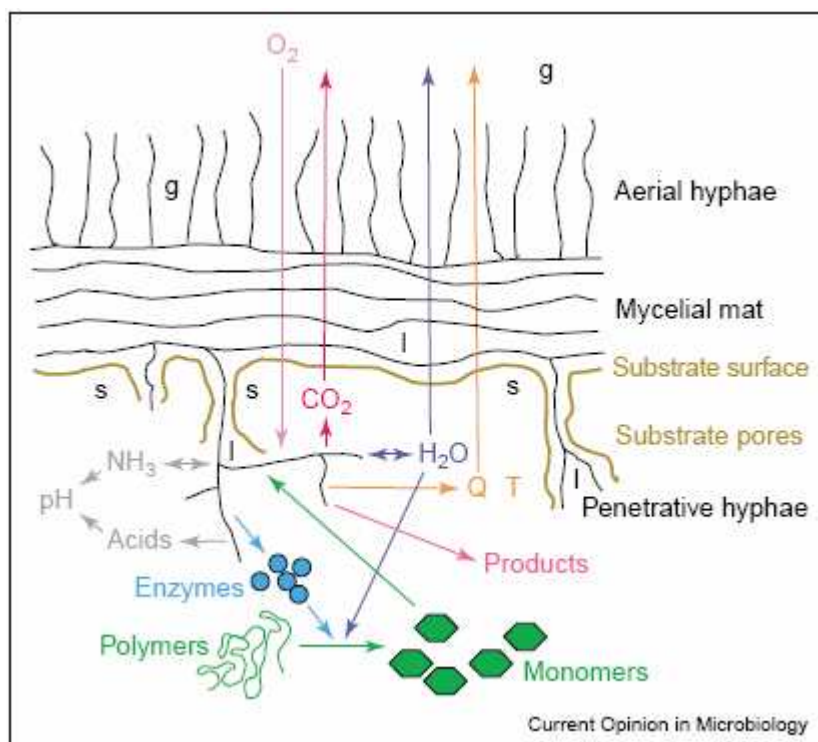


Fig 6; overgenomen uit Hoelker & Lenz (2005). 'Schematic of some of the microscale processes that occur during solid-state fermentation (SSF). After sporulation, fungal hyphae develop into a mycelial mat (black), which spreads over the surface of the particles that comprise the solid substrate (brown). From the mycelial mat, aerial hyphae protrude into the gaseous space, whereas others penetrate the substrate by growing into liquid-filled pores. At normal moisture levels, the void spaces between the aerial hyphae are



most likely to be filled with gas (g), whereas the void spaces within the mycelial mat and within the substrate are filled with liquid (l). The metabolic activities shown mainly occur near the substrate surface and within the pores; however, exposed regions of the mycelium (for instance the aerial hyphae) also show metabolism and there can be a transport of substances from the penetrative to the aerial hyphae. Hydrolytic enzymes (light blue), which are produced by the mycelium, diffuse to the solid matrix and catalyse the degradation of macromolecules into smaller units (green). The latter are taken up by the fungus to serve as nutrients. O<sub>2</sub> is consumed and CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, heat and interesting biochemical products are produced during fermentation. Hence, gradients develop within the biofilm that, for instance, force O<sub>2</sub> to diffuse from the gaseous phase into deeper regions of the biofilm (lilac) and CO<sub>2</sub> to diffuse from these regions to the gaseous phase (red). Heat development (Q; orange) leads to a fast increase in temperature (T), which is a serious problem during SSF. Heat is therefore removed from the substrate not only via conduction but also by evaporation, which is part of the complex balance of water in the system (dark blue). Beside evaporation, water balance includes water uptake by the mycelium in the course of growth, water consumption during hydrolysis reactions and water production through respiration. As another important factor, local pH, might be changed owing to the release of carbon acids and the exchange of ammonia (grey). The biochemical products of interest (magenta) that are released into the solid matrix and the liquid-filled spaces during fermentation might absorb to the solid and might have to be extracted for further use at the end of the process. All these and many other phenomena can strongly influence process performance during SSF.'

Het relatief grote aantal processen, met parameters die niet allen eenduidig te meten zijn, maakt het volgen van de procesgang niet gemakkelijk. Fernández & Pérez-Correa (2006) raden aan om te monitoren: 'Bed temperature, Bed water content, Bed porosity, Inlet air conditions, CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration (respirometric variables), Volatile metabolites, pH, Biomass concentration, Substrate concentration, Product concentration. Als 'Available Instrumentation for On-line Measurements' geven zij op: Temperature, Bed water content or water activity, Gas flow rate, pH, Bed porosity, Off-gas analysis (Volatile metabolites)'. Zie ook Lipták (1995), Bellon-Maurel et al (2003) en Adamchuk et al (2004). Champignonproductie op compost is vergelijkbaar met vaste-stoffermentatie en heeft dus dezelfde complexiteit.

Om van de complexiteit van vaste-stoffermentatie af te komen dienen we te onderzoeken of er ook met behulp van een voedingsvloeistof champignons gekweekt kunnen worden. Een relatief eenvoudig systeem voor vloeistof fermentatie, 'liquid culture', zal niet mogelijk zijn omdat de hechting aan een vast oppervlak voor uitgroeiende vruchtlichamen zeer waarschijnlijk noodzakelijk is (voor normaal gevormde vruchtlichamen is een vaste positie in een zwaartekrachtsveld nodig). De eigenschappen van schimmels kunnen anders zijn in vaste stof dan in vloeistof (Hoshino et al 2002, Aquilar et al 2004). Deze verschillen kunnen toegeschreven worden aan de complexere vorm van mycelium in vaste stof (Viniestra et al 2006). Op moleculair niveau is het verschil tussen kweek in vloeistof, zonder of op een drager, onderzocht voor een *Aspergillus* soort (Masai et al 2006, Feng et al 2006). Het is niet uit te sluiten dat moleculaire mechanismen voor vruchtlichaamvorming en benutting van vast substraat, of hechting, gekoppeld zijn en dat er rekening mee moet worden gehouden in een nieuw teeltsysteem met een voedingsoplossing. In het laatste geval zou gewerkt kunnen worden met de 'membrane-surface liquid culture with nonwoven fabric (MSLC-NF)' (Hoshino et al 2002).

## 5.3 andere paddenstoelen dan de champignon

In het verleden zijn er laboratoriummethoden ontwikkeld voor het verkrijgen van vruchtlichamen van hogere schimmels. Een belangrijke reden was de wens tot identificatie van deze schimmels, die traditioneel op kenmerken van vruchtlichamen en sporevorming berust (Badcock 1943, Tamblyn & Da Costa 1958). Soorten die gemakkelijk vruchtlichamen vormen zijn modelorganismen geworden in onderzoek naar de ontwikkelingsbiologie van hogere schimmels. Het gaat om:

- *Flammulina velutipes* (syn *Collybia velutipes*; het gewone fluweelpootje; Plunkett 1953, Aschan 1954, Gruen 1972, 1991)
- *Coprinopsis cinerea* (syn *Coprinus cinereus*, *C. fimetarius*, *C. macrorhizus*, *C. lagopus*, een andere soort, is foutief ook wel als naam gebruikt voor *C. cinerea*). De soort *C. congregatus*, wortelende inktzwam, is ook gebruikt in laboratoriumonderzoek maar hier gaat het waarschijnlijk niet om verwisseling met *C. cinerea*. (Madelin 1956, Kues 2000, Moore 2005, Liu et al 2006)
- *Schizophyllum commune*; waaiertje; Raper & Krongelb 1958, Niederpruem et al 1964. Wessels 1993, De Jong et al 2006, Palmer et al 2006).

Meer recent wordt vooral onderzoek gedaan aan *C. cinerea* en *S. commune*. In de natuur breken beide soorten cellulose af (Wengel et al 2006, Schneider et al 1999). Ze kunnen goed groeien en alle ontwikkelingsstadia laten zien op media met eenvoudige suikers en N-verbindingen; er is geen aanwijzing

voor de specifieke noodzakelijkheid van lignocellulose, humus of iets dergelijks voor hun groei.

Met *S. commune* zijn tamelijk lang geleden door Wessels (1965) voedingsproeven gedaan met het vervangen van de voedingsvloeistof bij een drager van zand ('replacement'; pendant van het overplaatsen van een cultuur naar vers medium, 'transfer'). Wessels (1965) stelde zo vast dat vruchtlichaamvorming mogelijk is door de re-allocatie van voedingsstoffen uit het mycelium naar de vruchtlichamen ('groei' ten koste van het eigen mycelium). Dit roept de vraag op of re-allocatie bij het mechanisme van vruchtlichaamvorming hoort. Ook kan men zich afvragen hoeveel mycelium eigenlijk nodig is als het mycelium er alleen toe zou dienen om voedingsstoffen uit het substraat op te nemen en door te geven aan zich ontwikkelende vruchtlichamen. Aan deze vragen is geen uitpunten literatuuronderzoek gedaan; wij houden het voor mogelijk dat er literatuur over bestaat, bijvoorbeeld uit de jaren 1950-80.

Ook *Pleurotus ostreatus* (Koch 1958, Eger 1976, Penas et al 1998), *Pholiota nameko* (Arita 1978, Lavalley 1971, Babasaki 2003), *Lentinula* (syn *Lentinus edodes*) (Leatham 1983, Matsuo et al 1992, Tan & Moore 1992) en *Stropharia / Psilocybe* (Heim, Badham) vormen vruchtlichamen onder laboratorium condities. Zelfs enkele mycorrhizapaddenstoelen, een groep waarin ook veel soorten voorkomen waarvan het mycelium niet in reïncultuur gebracht kan worden, kunnen knopjes of vruchtlichamen vormen onder laboratorium omstandigheden (Pantidou 1964, Giltrap 1981, Debaud & Gay 1987, Yamada et al 2001)

De genoemde soorten paddenstoelen en de champignon behoren tot verschillende ecologische en taxonomische groepen. Ecologisch gezien gaat het om 'white-rot fungi' die hout afbreken (*Flammulina*, *Lentinula*, *Pholiota*, *Pleurotus*) en 'litter decomposers' die strooisel afbreken (*Agaricus*, *Lepista*, *Coprinus*, *Coprinopsis*). Misschien dat een derde groep 'coprophilous fungi' (op mest groeiende schimmels) onderscheiden dienen te worden. *Coprinopsis* hoort hiertoe. Het onderscheid tussen deze groepen en de mogelijk verschillende eigenschappen van de schimmels die tot deze groepen behoren, zijn niet helemaal scherp. *Agaricus* soorten komen veelal in graslanden voor. Enkele eetbare soorten van graslanden, namelijk *Macrolepiota procera* (grote parasolzwam) en *Langermannia gigantea* (syn. *Calvatia gigantea*, reuzenbovist) zijn geen 'makkelijke' schimmels in een laboratorium of proefkweekrij: het mycelia groeien slecht en vruchtlichaamvorming blijft achterwege. *Agaricus* soorten zoals *A. bitorquis*, straatchampignon, *A. arvensis*, gewone anijschampignon, *A. subrufescens* (syns *A. blazei*, *A. brasiliensis*, *A. rufotegulis*) en *Coprinus comatus*, geschubde inktzwam, onderscheiden zich niet sterk van *A. bisporus* in teeltmogelijkheden. Taxonomisch gezien, op basis van genetische verwantschap, horen *Agaricus* en de boven genoemde soorten tot de basidiomyceten en daarin tot de groep van de 'euagarics'. De nauwkeurigste verwantschap wordt vastgesteld met moleculaire methoden en die van Walther et al 2005. Over de subgroep waartoe *A. bisporus* behoort (daar 'clade 82' genoemd) melden Moncalvo et al (2002): "... virtually all the taxa in the clade occur on the soil (none are primary wood decay organisms and none are known to be ectomycorrhizal) and fairy ring formation is a common feature in the Agaricaceae. The true puffballs (Lycoperdales) have many biochemical features in common with *Agaricus*, such as formation of urea, concentration of silver, mercury, selenium, and arsenic, and biosynthesis of methylmercury and arsenobetaine". Zowel ecologisch als taxonomisch lijkt *Agaricus* geen dusdanig unieke positie te hebben dat een geheel andere aanpak dan voor andere paddenstoelen geboden lijkt.

## 6 Discussie en Conclusies

### 6.1 een nieuw of een gerationaliseerd / geoptimaliseerd teeltsysteem

#### laboratoriummodel en voedingsonderzoek

Zowel voor een verbetering van het bestaande teeltsysteem als voor de ontwikkeling van een nieuw systeem dient er aanvullende kennis ontwikkeld te worden rond voeding en groei. Hiervoor is een laboratoriummodel nodig: kleinschalig, gecontroleerde en eenvoudig te veranderen omstandigheden (Fig 7). Het model dient te bestaan uit (een) drager(s) voor myceliumgroei en voor knopvorming. Deze dragers zouden inert moeten zijn, zelf geen directe chemische invloed moeten hebben op de groei. Iets dergelijks geldt voor de microbiologische omstandigheden; het model dient te functioneren onder steriele, aseptische, omstandigheden, waarbij voorkomen wordt dat (andere) micro-organismen een directe invloed op de groei kunnen hebben. Dragere maken het mogelijk met voedingsoplossingen te werken. Resultaten uit een dergelijk voedingsonderzoek zouden kunnen worden toegepast in het huidige teeltsysteem of kunnen worden doorontwikkeld tot een eigen nieuw teeltsysteem. Toepassing in het huidige systeem kan liggen in het meten en aanpassen van de voedingstoestand in compost en dekaarde; misschien ook tot een hogere conversie van compost in champignons en/of tot een 'verlenging van de levensduur' van compost en/of dekaarde. De teelt zou controleerbaarder kunnen worden en tot een beperking van de productie van reststoffen, champost, kunnen leiden.

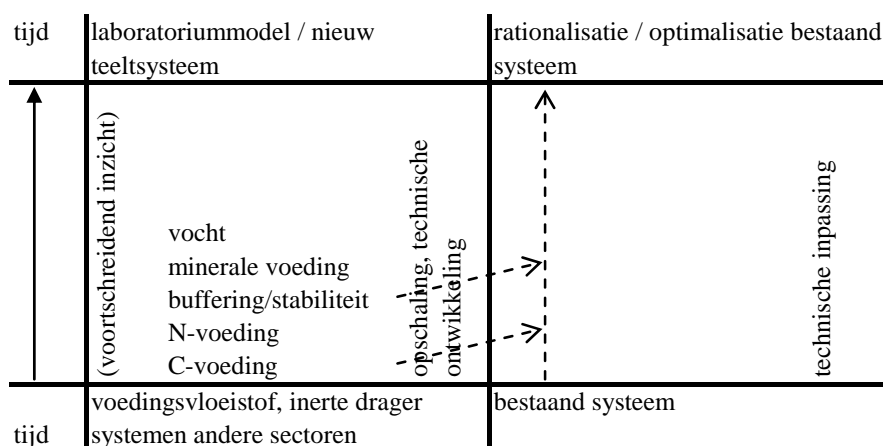


Fig 7. Twee sporen aanpak met een laboratoriummodel. Met een model met een chemisch gedefinieerde voedingsvloeistof en een inerte drager wordt kennis over groei en ontwikkeling van champignons opgedaan. Toepassingsspoor 1: parallel aan het laboratoriummodel kan een nieuw systeem worden ontwikkeld. Spoor 2: de kennis kan toegepast worden in conceptuele verbeteringen en optimalisaties van het huidige systeem.

Relevant in het teeltsysteem is het procesverloop en de regeling daarvan. Kenmerkend zijn de afbraak van droge stof met daaraan gekoppeld de productie van CO<sub>2</sub> en warmte. In het algemeen geldt dat voor een optimale procesgang de omstandigheden zoveel mogelijk 'constant' dienen te blijven. In de teelt wordt daarom geventileerd met (geconditioneerde) lucht die CO<sub>2</sub> en warmte afvoert; warmte vooral door verdamping van water ('ventilative heat management'). Aan warmte productie, 'activiteit', en verdamping wordt een grote betekenis toegekend in de praktijk. Het is onvoldoende duidelijk wat die betekenis is (zie ook Straatsma & Amsing 2005) omdat er geen kennis is over de effecten van de verschillende factoren apart; de factoren zijn in de praktijk gekoppeld. Voor een nieuw teeltsysteem is het daarom nog onbekend waarop een optimale regeling gebaseerd moet zijn, op set points van temperatuur, CO<sub>2</sub>-gehalte, relatieve luchtvochtigheid etc, of op productiesnelheden van warmte, CO<sub>2</sub> en waterdamphoeveelheden.

In een model-teeltsysteem is het waarschijnlijk mogelijk om, beter dan in de praktijk, verschillende deelprocessen tijdens de procesgang, zoals afvoer van warmte, CO<sub>2</sub> en vocht, onafhankelijk van elkaar te controleren en te onderzoeken. Ook via dit spoor kan optimalisatie van het huidige systeem tot stand komen.

#### ontwikkelingsstappen en teelfasen

Controle en sturing van de teelt zal denkkelijk de beste resultaten geven als ingegrepen wordt op de verschillende biologische ontwikkelingstappen (zie paragraaf 3.4). In het huidige teeltsysteem zijn de compostproductie, de myceliumgroei en de dekaarde-ingroei/oogstperiode gescheiden. Tussentijdse opslag van fase II compost en/of van doorgroeide compost is in principe mogelijk. Het is niet ondenkbaar dat dekaarde-ingroei en knopvorming ontkoppeld kunnen worden van de oogstperiode zoals deels gebeurt in een éénlaags-oogststelsel. Kunnen primordien of knoppen in een apart systeem geproduceerd worden en daarna 'gezaaid' of getransplanteerd? Kan het zaai- of transplantatiemateriaal tussentijds worden opgeslagen waardoor een sterk verbeterde afstemming van teelt, oogst en afzet mogelijk wordt?

#### teeltsysteem met drager en vloeistofvoeding

Uit voedingsonderzoek met een laboratoriummodel zoals hierboven aangegeven kan een eerste generatie teeltsysteem ontwikkeld worden.

Het is mogelijk om champignonmycelium in grote hoeveelheden in een vloeistoffermentor te kweken; misschien kan uit zo een kweek (continue) geoogst worden en kan mycelium verwerkt worden tot myceliumeenheden die precies één champignon vormen. Overigens is niet bekend of een bepaalde minimale hoeveelheid mycelium strikt noodzakelijk is voor de groei van een champignon; ook niet of er een minimum geldt voor een combinatie van (heel weinig) mycelium en enige beschikbare voeding.

## 6.2 noodzakelijke aanpak en mogelijkheden

- Het is noodzakelijk om meer kennis te ontwikkelen over de voeding van de champignon bij knopvorming en vruchtlichaamuitgroei. De huidige kennis is gebaseerd op de groei op compost. Dit substraat is zo complex in samenstelling dat het vrijwel ondoenlijk is om het belang van de verschillende voedingscomponenten te bepalen. Ook zijn de moleculair/fysiologische mechanismen waarmee de champignon compost afbreekt complex en kan bijna niet vastgesteld worden of de champignon optimaal gebruik maakt van het substraat.
- In het huidige teeltsysteem gebruikt de champignon koolstof die door het mycelium vrijgemaakt wordt uit lignocellulose. Lignocellulose is echter geen beslissende voorwaarde; groei en ontwikkeling zijn mogelijk op een chemisch ongedefinieerde, natuurlijke, zetmeelbron.
- Om meer kennis over de voeding van de champignon te ontwikkelen is een laboratoriummodel nodig waarin de voeding kleinschalig en onder gecontroleerde en eenvoudig te veranderen omstandigheden onderzocht kan worden. Het dient te gaan om een systeem met (een) inerte drager(s) en (chemisch gedefinieerde) voedingsoplossing(en).
- Het laboratoriummodel biedt de mogelijkheid te achterhalen welke voedingsstoffen op welke momenten noodzakelijk zijn. Deze kennis kan gebruikt worden om te bepalen op welke voedingsstoffen we ons moeten richten in het huidige systeem. Zijn deze stoffen op het juiste moment in optimale hoeveelheid aanwezig? Daarmee kunnen gericht de knelpunten worden opgelost in het huidige systeem.
- Een functionerend laboratoriummodel is een eerste generatie teeltsysteem op drager(s) met voedingsoplossing(en).
- Er is veel kennis beschikbaar over teeltsystemen voor en voeding van planten, schimmels en bacteriën.

Uit wat er bekend is over schimmels en paddenstoelen valt beslist niet af te leiden dat een voedingssysteem voor de champignon met dragers en vloeistof in technisch/biologische zin onrealistisch is. Integendeel; het is opmerkelijk dat er nog geen functionerend laboratoriummodel voor de teelt van champignons is.

- Meer kennis over de processen van knopvorming en uitgroei kan helpen om de teelt in meerdere fasen op te splitsen wat de controle over uitgroei en oogst kan verbeteren.

# Referenties

- Adamchuk VI, Hummel JW, Morgan MT & Upadhyaya SK. 2004. On-the-go soil sensors for precision agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture* 44, 71-91.
- Aksu S & Gunay A. 1999. Studies on mushroom production in aquaculture with tuff and perlite (in Turkish). *Turkish journal of Agriculture and Forestry* 23, 297-303.
- Aguilar CN, Contreras-Esquivel JC, Rodriguez R, Prado LA, Loera O. 2004. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Science and Biotechnology* 13, 109-113.
- Amsing JGM & Gerrits JPG. 1991. Water balance in a mushroom bed. *Mushroom Science* 13, 275-280.
- Amsing JGM, Straatsma G & van Erp PJ. 2002. Intern vocht. PPO Paddestoelen 2002-8
- Anupama & Ravindra P. 2000. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances* 18, 459-479.
- Arita I. 1978. *Pholiota nameko*. In "The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms", eds. Chang ST and Hayes WA. Academic Press, New York, pp. 475-496.
- Aro N, Pakula T & Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 719-739.
- Aschan K. 1954. The production of fruit bodies in *Collybia velutipes* 1. Influence of different culture conditions. *Physiologia Plantarum* 7, 571-591
- Babasaki K, Masuno K & Murata H. 2003. Interactions of heterologous mycelia colonized in the substrate govern fruit body production in the cultivated Homobasidiomycete *Pholiota nameko*. *Bioscience Biotechnol. Biochem.* 67, 100-106.
- Badcock EC. 1943. Methods for obtaining fructifications of wood-rotting fungi in culture. *Transactions of the British Mycological Society* 26, 127-132.
- Bechara MA, Heinemann P, Walker PN, Romaine CP & Heuser CW. 2004. Novel Methods of Cultivating *Agaricus bisporus*. ASAE/CSAE Meeting Paper No. 047001.
- Bechara MA, Heinemann P, Walker PN & Romaine CP. 2006a. Non-composted grain-based substrates for mushroom production (*Agaricus bisporus*). *Transactions of the ASABE* 49, 819-824.
- Bechara MA, Heinemann P, Walker PN & Romaine CP. 2006b. *Agaricus bisporus* mushroom cultivation in hydroponic systems. *Transactions of the ASABE* 49, 825-832.
- Bellon-Maurel W, Orliac O, Christen P. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry* 38, 881-896.
- Bruce HL. 2004. Where will your industry be 'the day after tomorrow'? *Australian Journal of Dairy Technology* 59, 132-134.
- Bruggeman FJ & Westerhoff HV. 2006. Approaches to biosimulation of cellular processes. *Journal of Biological Physics* 32, 273-288.
- Castle AJ, Horgen PA & Anderson JB. 1988. Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (= *A. bisporus*). *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1643-1648
- Cox RJ & Niederpruem DJ. 1975. Differentiation in *Coprinus lagopus*. 3, Expansion of excised fruit-bodies. *Archives of Microbiology* 105, 257-260.
- Daniel G, Volc J & Niku Paavola ML. 2004. Cryo-FE-SEM & TEM immuno-techniques reveal new details for understanding white-rot decay of lignocellulose. *Comptes Rendus Biologies* 327, 861-871.
- Debaud JC & Gay G. 1987. In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* 105, 429-435.
- De Groot PWJ, Schaap PJ, Van Griensven LJLD & Visser J. 1997. Isolation of developmentally regulated genes from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology UK* 143, 1993-2001.
- De Jong JF, Deelstra HJ, Wosten HAB, Lugones LG. 2006. RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1267-1269
- Dijkstra FY, Scheffers WA & Wiken TO. 1972. Submerged growth of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 38, 329-340.
- Dütsch GA. 1978. Submerged culture of *Agaricus bisporus* in a synthetic medium. *Bulletin British Mycological Society* 12: 119.
- Eger G. 1961. Untersuchungen ueber die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkoerperbildung des

- Kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lge. Archiv fuer Mikrobiologie 39, 313-334.
- Eger G. 1976. Rapid method for breeding *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Science 9, 567-576.
- Feng B, Morita M, Imanaka H, Imamura K & Nakanishi K. 2006. Identification of genes from *Aspergillus oryzae* that are preferentially expressed in membrane-surface liquid culture. Journal of Bioscience and Bioengineering 102, 470-473.
- Fernández M & Pérez-Correa J. 2006. Instrumentation for Monitoring SSF Bioreactors. In: Solid-State Fermentation Bioreactors, Fundamentals of Design and Operation. Mitchell DA, Berovič M & Krieger N. (eds) Springer. pp 363-374.
- Flegg PB. 1978. Effect of temperature on sporophore initiation and development in *Agaricus bisporus*. Mushroom Science 10(1), 595-602.
- Gerrits JPG, Bels-Koning HC & Muller FD. 1967. Changes in compost constituents during composting, pasteurization and cropping. Mushroom Science 6, 225-243.
- Gerrits JPG. 1969. Organic compost constituents and water utilized by the cultivated mushroom during spawn run and cropping. Mushroom Science 7, 111-126.
- Gerrits JPG. 1989. Supplementation of *Agaricus* compost with organic materials with special attention to the uptake of minerals and amino acids. Mushroom Science 12(1), 361-370.
- Gerrits JPG & Amsing JGM. 1994. Bijvoeden en plastic in relatie tot het stikstof- en vochtgehalte van doorgroeide compost. Champignoncultuur 38, 381-385.
- Gerrits JPG, Amsing JGM, Straatsma G & van Griensven LJLD. 1995. Fase I in tunnels voor de productie van *Agaricus bisporus* met speciale aandacht voor het belang van water. Champignoncultuur, 399-409
- Gerrits JPG. 1997. Vochtgehalte en volumegewicht van indoor compost. Champignoncultuur 41, 179-183 [Fase I niet altijd nodig voor goede productie. Groenten en Fruit / Paddestoelen 28, 11]
- Gerrits JPG & Amsing JGM. 1997. Ammoniumsulfaat als aanvullende stikstofbron in indoor compost bij gebruik van water uit luchtwassers. Champignoncultuur 41, 243-251
- Giltrap NJ. 1981. Formation of primordia and immature fruiting bodies by ectomycorrhizal fungi in culture. Transactions of the British Mycological Society 77, 204-205.
- Glass NL, Rasmussen C, Gabriela Roca M & Read ND. 2004. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. Trends in Microbiology 12, 135-141.
- Goody GW. 1974. Control of development of excised fruit bodies and stipes of *Coprinus cinereus*. Transactions of the British Mycological Society 62, 391-399.
- Gruen HE. 1963. Endogenous Growth Regulation in Carpophores of *Agaricus bisporus*. Plant Physiology 38, 652-666
- Gruen HE & Wu SH. 1972. Dependence of fruit-body elongation on mycelium in *Flammulina velutipes*. Mycologia 64, 995-
- Gruen HE. 1991. Effects of grafting on stipe elongation and pileus expansion in the mushroom *Flammulina velutipes*. Mycologia 83, 480-491
- Hammond JBW & Nichols R. 1975. Changes in respiration and soluble carbohydrates during the post-harvest storage of mushrooms (*Agaricus bisporus*). Journal of the Science of Food and Agriculture 26, 835-842.
- Heckman CA, Pelok SD, Kimpel SA & Wu LC. 1989. Scanning electron-microscope studies on fruitbody primordium formation in *Agaricus bisporus*. Mycologia 81, 717-727
- Hoelker U & Lenz J. 2005. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology 8, 301-306.
- Horn SJ, Sikorski P, Cedervist JB, Vaaje-Kolstad G, Sorlie M, Synstad B, Vriend G, Varum KM & Eijsink VGH. 2006. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 18089-18094.
- Hoshino K, Yuzuriha M, Morohashi S, Kagaya S & Taniguchi M. 2002. Production of laccase by membrane-surface liquid culture with nonwoven fabric of *Coriolus versicolor*. In: Biological Systems Engineering, 830: 108-120, ACS Symposium Series.
- Huhnke W & von Sengbusch R. 1969. Champignonanbau auf nicht kompostiertem Nahsubstrat. Mushroom Science 7, 405-419.
- Ishida, BK. 1991. Developmental regulation is altered in the calyx during invitro ovary culture of tomato. Plant Cell 3, 219-223

- Jacobson MF. 2003. Adverse reactions linked to Quorn-brand foods. *Allergy* 58, 455-456
- Kamminga - van Wijk C, Prins HBA & Kuiper PJC. 1992. Mycorrhizal and nonmycorrhizal douglas-fir grown in hydroculture - the effect of nutrient concentration on the formation and functioning of mycorrhiza. *Acta Botanica Neerlandica* 41, 481-495
- Koch W. 1958. Untersuchungen ueber Mycelwachstum und Fruchtkoerperbildung bei einigen Basidiomyceten (*Polystictus versicolor*, *Polyporus annosus*, *Pleurotus ostreatus* und *Psalliota bispora*). *Archiv fuer Mikrobiologie* 30, 409-432.
- Krishna C. 2005. Solid-state fermentation systems - An overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1-30
- Kritskii MS, Kulaev IS, Mairova IP, Fais DA & Belozerskii AN. 1965. Translocation of phosphates in the sporophores of *Agaricus bisporus*. *Biokhimiya* 30, 778-789. (translated)
- Kues U. 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and molecular biology reviews* 64, 316-
- Kues U & Liu Y. 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 141-152
- Laborde J. 1995. PRINS, a truly environment safe process for the rapid preparation of substrates, without composting, for the cultivation of edible fungi, including *Agaricus bisporus*.
- Leatham GF. 1983. A chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*. *Mycologia* 75, 905-908.
- Lee YJ & George E. 2005. Development of a nutrient film technique culture system for arbuscular mycorrhizal plants. *Hortscience* 40, 378-380
- Lipták BG. 1995. Instrument engineers' handbook: process measurement and analysis. Radnor, Pennsylvania, Chilton Book Co.
- Liu Y, Srivilai P, Loos S, Aebi M & Kues U. 2006. An Essential Gene for Fruiting Body Initiation in the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* Is Homologous to Bacterial Cyclopropane Fatty Acid Synthase Genes. *Genetics* 172, 873-884
- Lonnerdal B. 2002. Expression of human milk proteins in plants. *Journal of the American College of Nutrition* 21, 218s-221s
- Madelin MF. 1956. Studies on the nutrition of *Coprinus lagopus* Fr., specially as affecting fruiting. *Annals of Botany* 20, 307-330.
- Masai K, Maruyama JI, Sakamoto K, Nakajima H, Akita O & Kitamoto K. 2006. Square-plate culture method allows detection of differential gene expression and screening of novel, region-specific genes in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 881-891
- Matsuo N, Binmohamed AB, Meguro S, Kawachi S. 1992. The effects of yeast extract on the fruiting of *Lentinus edodes* in a liquid-medium. *Mokuzai Gakkaishi* 38, 400-402
- Mitchell DA, Berovič M & Krieger N. 2006. Introduction to Solid-State Fermentation, Bioreactors. In: *Solid-State Fermentation Bioreactors, Fundamentals of Design and Operation*. Mitchell DA, Berovič M & Krieger N. (eds) Springer. pp 33-44.
- Molloy S. 2004. Sugar transport and water relations of *Agaricus bisporus*. PhD thesis Cranfield University.
- Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA, Johnson JE, James TY, Aime MC, Hofstetter V, Verduin SJW, Larsson E, Baroni TJ, Thorn RG, Jacobsson S, Clemençon H & Miller OK. 2002. One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 357-400
- Moore D. 2005. Principles of mushroom developmental biology. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7, 79-101.
- Morales P & Thurston CF. 2003. Efficient isolation of genes differentially expressed on cellulose by suppression subtractive hybridization in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 107, 401-407.
- Mosse B & Thompson JP. 1984. Vesicular - arbuscular endomycorrhizal inoculum production .1. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Canadian Journal of Botany* 62, 1523-1530
- Nickerson KW, Atkin AL & Hornby JM. 2006. Quorum sensing in dimorphic fungi: Farnesol and beyond. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3805-3813
- Niederpruem DJ, Hobbs H & Henry I. 1964. nutritional studies of development in *Schizophyllum commune*. *Journal of Bacteriology*
- Nitsch JP. 1951. Growth and development invitro of excised ovaries. *American Journal of Botany* 38, 566-577



- Noble R, Fermor TR, Lincoln S, Dobrovin-Pennington A, Evered C, Mead A & Li R. 2003. Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. *Mycologia* 95, 620-629
- Nyende AB, Schittenhelm S, Mix-Wagner G & Greef JM. 2003. Production, storability, and regeneration of shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.) encapsulated in calcium alginate hollow beads. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 39, 540-544
- Nylund JE & Wallander H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytologist* 112, 389-398
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O & Iwashita K. 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3448-3457
- Palmer GE & Horton JS. 2006. Mushrooms by magic: making connections between signal transduction and fruiting body development in the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiology Letters* 262, 1-8.
- Pantidou ME. 1964. Cultural Studies of Boletaceae: Carpophores of *Xerocomus badius* and *Xerocomus illudens* in culture. *Canadian Journal of Botany* 42, 1147-1149.
- Patel AV, Pusch I, Mix-Wagner G & Vorlop KD. 2000. A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. *Plant Cell Reports* 19, 868-874
- Pel HJ et al (nog 68 auteurs). 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* 25, 221-231
- Penas MM, Asgeirsdottir SA, Lasa I, Culienez-Macia FA, Pisabarro AG, Wessels JGH & Ramirez L. 1998. Identification, characterization, and in situ detection of a fruit-body-specific hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4028-4034
- Perez FJ, Meza P, Berti M & Pinto M. 2000. Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61, 37-40
- Plunkett BE. 1953. Nutritional and Other Aspects of Fruit-body Production in Pure Cultures of *Collybia velutipes* (Curt.) Fr. *Annals of Botany* 17, 193-217.
- Price ND, Reed JL & Palsson BO. 2004. Genome-scale models of microbial cells: Evaluating the consequences of constraints. *Nature Reviews Microbiology* 2, 886-897.
- Raper JR & Krongelb GS. 1958. Genetic and environmental aspects of fruiting in *Schizophyllum commune* Fr. *Mycologia* 50, 707-740
- Rast D. 1966. Translokation von Mannitol im Fruchtkoerper von *Agaricus bisporus*. *Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 76, 176-184
- Reijnders AFM. 1977. The histogenesis of bulb and trama tissue of the higher basidiomycetes and its phylogenetic implications. *Persoonia* 9, 329-362
- San Antonio JP. 1971. A laboratory method to obtain fruit from cased grain spawn of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 63, 16-21.
- Sanchez C, Moore D & Diaz-Godinez G. 2006. Microscopic observations of the early development of *Pleurotus pulmonarius* fruit bodies. *Mycologia* 98, 682-689.
- Schneider P, Caspersen MB, Mondorf K, Halkier T, Skov LK, Ostergaard PR, Brown KM, Brown SH & Xu F. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 502-508
- Sikkeland LIB, Thorgersen EB, Haug T & Mollnes TE. 2007. Complement activation and cytokine response by BioProtein, a bacterial single cell protein. *Clinical and Experimental Immunology* 148, 146-152
- Sinden JW, Tschierpe HJ, Hauser E. 1962. Transplantation of sporophores as a new method for studying growth and nutritional factors of mushrooms. *Mushroom Science* 5, 250-266
- Souret FF, Kim Y, Wysiouzil BE, Wobbe KK & Weathers PJ. 2003. Scale-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 653-667
- Steffen KT, Hofrichter M & Hatakka A. 2000. Mineralisation of C-14-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 819-825.
- Steiner AA. 1985. The history of mineral plant nutrition till about 1860 as source of the origin of soilless culture methods. *Soilless-Culture* 1, 7-24.

- Straatsma G & Van Griensven LJLD. 1986. Growth requirements of mycelial cultures of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. Transactions of the British Mycological Society 87, 135-141.
- Straatsma G, Gerrits JPG, Augustijn MPAM, op den Camp HJM, Vogels GD & van Griensven LJLD. 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilum* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology 135, 751-75
- Straatsma G, Di Lena G, Olijnsma TW, Op den Camp HJM & Van Griensven LJLD. 1993. Laboratory media for measuring growth parameters of *Agaricus bisporus* mycelium as influenced by *Scytalidium thermophilum*. Cultivated Mushroom Res. Newsl. 1,1-6.
- Straatsma G, Gerrits JPG, Gerrits TM, Op den Camp HJM & Van Griensven LJLD. 1991. Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). Journal of General Microbiology 137, 1471-1477
- Straatsma G, Samson RA, Olijnsma TW, Gerrits JPG, Op den Camp HJM & van Griensven LJLD. 1995. Bioconversion of cereal straw into mushroom compost. Canadian journal of Botany 73 (suppl.1), S1010-S1024
- Straatsma G, Olijnsma TW, Swinkels HATI & Baar J. 2004. Seizoensinvloed op de kwaliteit van stro en op het stro in paardenmest; Oplossingen voor procesvoering en compost-kwaliteit. PPO-Paddestoelen, 2004-8.
- Straatsma G. 2005. Monitor voor bijsturing van knopvorming. PPO Paddestoelen, 2005-9
- Straatsma G & Amsing JGM. 2005. Literatuurstudie vocht in compost, dekaarde en champignons. PPO Paddestoelen, 2005-17
- Straatsma G, Amsing JGM, Olijnsma TW & Baar J. 2005. Van veenhoudende dekaarde naar een duurzaam systeem voor knopvorming en uitgroei van champignons. LNV
- Straatsma G, Olijnsma TW, Paradi I & Baar J. 2006. Minerale voeding van de champignon. PPO Paddestoelen, 2006-1.
- Straatsma G & Van Loon PCC. 2007. Innovatieve teeltsturing: 2. Beeldanalyse voor bijsturing van de knopvorming; onderdeel van computer met groene vingers. PT
- Suresh B, Bais HP, Raghavarao KSMS, Ravishankar GA & Ghildyal NP. 2005. Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula* L. hairy roots as a model system. Process Biochemistry 40 (5): 1509-1515
- Takano M, Abe H & Hayashi N. 2006. Extracellular peroxidase activity at the hyphal tips of the white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. Journal of Wood Science 52, 429-435
- Tamblyn N & DaCosta EWB. 1958. Simple technique for producing fruit bodies of wood-destroying basidiomycetes. Nature 181, 578-579.
- Tan YH & Moore D. 1992. Convenient and effective methods for invitro cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. Mycological Research 96, 1077-1084
- Ten Have R, Straatsma G & Schaap PJ. 2003. Analysis of the extracellular proteome of *Agaricus bisporus*. Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie 11, S47
- Teusink B, Wiersma A, Molenaar D, Francke C, de Vos WM, Siezen RJ & Smid EJ. 2006. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. Journal of Biological Chemistry 281, 40041-40048.
- Till O. 1962. Champignonkultur auf sterilisiertem Nährsubstrat und die Wiederverwendung von abgetragenen Kompost. Mushroom Science 5, 127-133.
- Treschow C. 1944. Nutrition of the cultivated mushroom. Munksgaard, Copenhagen.
- Turner EM, Wright M, Ward T, Osborne DJ & Self R. 1975. Production of ethylene and other volatiles and changes in cellulase and laccase activities during the life cycle of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology 91, 167-176.
- Turner EM. 1977. Development of excised sporocarps of *Agaricus bisporus* and its control by CO<sub>2</sub>. Transactions of the British Mycological Society 69, 183-186.
- Umar MH & Van Griensven LJLD. 1997. Morphological studies on the life span, developmental stages, senescence and death of fruit bodies of *Agaricus bisporus*. Mycological Research 101, 1409-1422.
- Umar MH & Van Griensven LJLD. 1998. The role of morphogenetic cell death in the histogenesis of the mycelial cord of *Agaricus bisporus* and in the development of macrofungi. Mycological Research 102, 719-735.

- Villena GK & Gutierrez Correa M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiology* 43, 262-268
- Vinck A, Terlouw M, Pestman WR, Martens EP, Ram AF, van den Hondel CAMJJ & Wosten HAB. 2005. Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology* 58, 693-699.
- Viniegra-Gonzalez G & Favela-Torres E. 2006. Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technology and Biotechnology* 44, 397-406.
- Wagemaker MJM, Eastwood DC, van der Drift C, Jetten MSM, Burton K, Van Griensven LJLD & Op Den Camp HJM. 2006. Expression of the urease gene of *Agaricus bisporus*: a tool for studying fruit body formation and post-harvest development. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 486-492.
- Walser PJ, Velagapudi R, Aebi M, Kües U. 2003. Extracellular matrix proteins in mushroom development. *Rec Res Dev Microbiol* 7, 381-415
- Walther G, Garnica S & Weiss M. 2005. The systematic relevance of conidiogenesis modes in the gilled Agaricales. *Mycological Research* 109, 525-544.
- Wayne RR. 2001. Growing mushrooms the easy way. Home mushroom cultivation with hydrogen peroxide. vol 1 & vol 2.
- Wessels JGH. 1965. Carbohydrate metabolism and morphogenesis in *Schizophyllum commune*. *Mushroom Science* 6, 167-178. / Morphogenesis and biochemical processes in *Schizophyllum commune* Fr. *Wentia* 13, 1-113.
- Wessels JGH. 1993. Fruiting in the higher fungi. *Advances in Microbial Physiology* 34, 147-202.
- Whiteford JR & Thurston CF. 2000. The molecular genetics of cultivated mushrooms. *Advances in Microbial Physiology* (book series) 42, 1-23.
- Wiebe MG. 2002. Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 421-427
- Wood DA & Goodenough PW. 1977. Fruiting of *Agaricus bisporus*; changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. *Archives of Microbiology* 114, 161-165.
- Wu HH, Zhao XJ, Zhang CQ & Liu JX. 2004. Establishment of mammary tissue culture: an in vitro model for bovine lactation. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13, 575-578 Suppl. 1 2004
- Yamada A, Ogura T & Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11, 59-66.
- Yamada M, Sakuraba S, Shibata K, Taguchi G, Inatomi S, Okazaki M & Shimosaka M. 2006. Isolation and analysis of genes specifically expressed during fruiting body development in the basidiomycete *Flammulina velutipes* by fluorescence differential display. *FEMS Microbiology Letters* 254, 165-172.
- Ziv M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81, 277-285.