

Heeft Champost waarde als biobased product?

J.J.P. Baars & A.S.M. Sonnenberg



Rapportage PT project

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Plant Breeding

December 2015

DOI: 10-18174/420932
Rapport 2015-5
TKI T&U: KV1310-032

© 2015 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International, Plant Breeding.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International , onderdeel van Wageningen UR Business Unit Plant Breeding

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 – 48 13 35
Fax : 0317 – 48 34 57
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.wageningenUR.nl/pri

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	2
3. Testen van schimmelgroei op champost	5
3.1 Gebruikte champost	5
3.2 Gebruikte schimmelstammen	5
3.3 Geteste substraten	5
3.3.1 Groei op champost	5
3.3.2 Groei op mengsels van champost	6
3.4 Discussie	7
4. Toegankelijkheid cellulose en hemicellulose na behandeling van champost met schimmels	9
4.1 Effect doorgroeiing van champost met witrot schimmels op het lignine-gehalte.	9
4.2 Vermogen van witrot-schimmels om cellulose in champost beschikbaar te maken voor enzymatische afbraak.	9
4.3 Discussie	10
5. Champost als bron van enzymen	12
5.1 Maken van een enzymextract.	12
5.2 Bepalen van de enzymactiviteit	12
5.2.1 Cellulase activiteit	12
5.2.2 Hemicellulase activiteit	13
5.3 Discussie	14
6. Champost als substraat component in de teelt van koningsoesterzwam (<i>Pleurotus eryngii</i>)	15
6.1 Karakterisatie van de gebruikte champost.	15
6.2 Substraatsamenstellingen	15
6.3 Teeltverloop	16
6.4 Conclusie	18
7. Geciteerde literatuur	20
Bijlage I Meetgegevens teeltproef met champost als vervanger voor zaagsel.	1

1. Samenvatting

Dit rapport beschrijft de resultaten van onderzoek naar de vraag of Champost waarde heeft als biobased product. Dit onderzoek was onderdeel van een groter project met de titel "Increasing utilization of organic waste and low value feeds with the help of lignin degrading fungi".

Champost heeft als globale samenstelling 359 kg droge stof per ton versgewicht. Deze 359 kg droge stof bestaat voor ongeveer 138 kg as en voor ongeveer 222 kg uit organische stof. Deze 222 kg organische stof bestaat uit ruwweg 56 kg lignine, 54 kg cellulose en 4 kg hemicellulose. De overige 108 kg droge stof is wateroplosbaar. Precieze verhoudingen tussen deze componenten van champost kunnen van batch tot batch verschillen.

De hypothese is dat het lignine de cellulose en hemicellulose in de champost beschermt tegen afbraak door de champignon. In het onderzoek is geprobeerd of champost gekoloniseerd kon worden door witrot schimmels die goed in staat zijn om lignine af te breken. De witrotschimmels zouden daardoor (een deel van) de resterende cellulose en hemicellulose beschikbaar kunnen maken voor nieuwe toepassingen.

Typische witrotschimmels zoals *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajoraj*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*, *Clitocybula dusejii*, *Gymnopilus sapineus* en *Bjerkandera adusta* zijn in staat om uit (gesteriliseerde) champost nog voldoende voeding te halen voor vegetatieve groei. De witrotters *Lentinula edodes* en *Ceriporiopsis subvermispora* en de schimmels *Stropharia rugoseoannulata* en *Lepista nuda* bleken niet in staat te groeien op champost. De schimmels die op (gesteriliseerde) champost konden groeien waren in staat om het ligninegehalte in champost te verlagen. Onbehandelde champost had een ligninegehalte van ongeveer 32%. *Pleurotus eryngii* was in staat om het ligninegehalte te verlagen tot 21%. De overige schimmels lieten een kleinere verlaging van het ligninegehalte zien.

De toegankelijkheid voor enzymen van het cellulose en hemicellulose na behandeling met schimmels werd getest met pensmicroorganismen. De microorganismen in de pens zijn efficiënte afbrekers van cellulose en hemicellulose, maar ze zijn niet in staat om lignine af te breken. De hoeveelheid cellulose en hemicellulose die wordt afgebroken is evenredig met de hoeveelheid biogas die deze microorganismen produceren. Er bleek een keurige positieve relatie te bestaan tussen de verlaging van de hoeveelheid lignine in de champost en de hoeveelheid geproduceerd biogas. Echter de maximale hoeveelheid biogas die kon worden geproduceerd op basis van schimmel behandelde champost bleef ver achter bij de hoeveelheid biogas die kan worden geproduceerd op basis van tarwestro. Daardoor is het gebruik van champost als feedstock voor biobased toepassingen niet rendabel.

In een tweede deel van het project is gekeken naar de mogelijkheid om polysaccharideafbrekende enzymen te extraheren uit champost. Het enzymextract dat uit champost kon worden gewonnen bleek nauwelijks cellulase activiteit te bevatten. Er was wel een aanzienlijke hemicellulase activiteit. Echter, aangezien polysaccharide afbrekende enzymen tegenwoordig tegen lage kostprijs kunnen worden geproduceerd is het zeer de vraag of winning van hemicellulases uit champost daar mee kan concurreren. Er is wel een markt voor hemicellulases met speciale specificiteiten, maar het is onwaarschijnlijk dat champignon dergelijke hemicellulases maakt.

Tot slot is geprobeerd of champost zou kunnen dienen als substraatcomponent in de teelt van koningsoesterzwam. Teeltresultaten lieten zien dat vervanging van 27% van het zaagsel in het substraatmengsel geen negatief of positief effect heeft op de opbrengst aan paddenstoelen. In het zaagsel in het substraatmengsel wordt vervangen door champost, daalt de opbrengst aan oesterzwammen met 35%. Voor alle substraatmengsels met champost bleek echter dat de kolonisatie door koningsoesterzwam mycelium ongeveer anderhalf keer zo lang duurt. Deze relatief trage ingroei van het mycelium maakt het onwaarschijnlijk dat in de praktijk champost in het substraat voor koningsoesterzwam zal worden verwerkt.

2. Inleiding

Het onderzoek naar de vraag of Champost waarde heeft als biobased product is onderdeel van een groter project met de titel “Increasing utilization of organic waste and low value feeds with the help of lignin degrading fungi”.

Het doel van dit door STW gefinancierde project (STWnr 11611) is om schimmels te gebruiken om lage kwaliteit voer en organisch afval op te waarderen, zodat het na behandeling een hogere voedingswaarde heeft voor herkauwers en gebruikt kan worden bio-fermentatoren voor de productie van vluchtige vetzuren en methaan en voor de productie van ethanol. De belangrijkste beperkende factor in deze lage kwaliteit diervoeders en afvalstoffen is de aanwezigheid van een hoog gehalte aan lignine. Hierdoor kunnen de waardevolle koolhydraten in plantaardige celwanden niet benut worden. Lignine kan niet worden afgebroken middels anaerobe vergisting, zoals dat in de pens van herkauwers plaatsvindt. Alleen schimmels zijn in staat om de complexe structuren van lignine af te breken. Schimmels die worden gebruikt om paddenstoelen te produceren op lignocellulose complexen zijn aangepast aan deze complexe substraten. Deze schimmels hebben een strategie om het substraat eerst te koloniseren en modificeren daarbij het substraat op een zodanige wijze dat de (hemi) cellulose heel snel beschikbaar kan komen als de paddenstoelen worden geproduceerd. Gedurende de vegetatieve groei produceren deze schimmels bij voorkeur enzymen die gericht zijn op het afbreken en/of modificeren van lignine, om voor de vorming van de paddenstoelen heel snel te kunnen overschakelen op de afbraak van cellulose en hemicellulose. Door het proces te stoppen voordat vruchtlichamen gevormd worden, zal dat resulteren in een substraat met minder lignine en minder beperkingen voor de afbraak van de celwandkoolhydraten. Dus, sommige soorten witrot-schimmels zijn in staat om specifiek lignine af te breken en/of te modificeren tijdens de vegetatieve groei, zonder dat de andere koolhydraten in plantaardige celwanden worden afgebroken. Met behulp van deze schimmels wordt de afbreekbaarheid van de substraten (plantencelwanden) verbeterd, hetgeen resulteert in een hogere voederwaarde en verhoogde synthese van vluchtige vetzuren, en wanneer deze substraten worden toegepast in bio-fermentatoren, een verhoogde synthese van methaan en vluchtige vetzuren.

De delignificeerde substraten kunnen niet alleen worden gebruikt als voer voor herkauwers, maar ook als substraat voor de productie van methaan (co-vergisting), chemische componenten (vluchtige vetzuren, suikers) en (bio) ethanol. Daarnaast biedt co-vergisting van het voorbehandelde organische materiaal met afvalwater slib een manier om waterzuiveringsinstallaties netto energieproducenten te maken.

In dit project wordt onderzoek gedaan naar de meest geschikte schimmels en de meest optimale condities voor maximale afbraak cq. modificatie van lignine, voor een maximale beschikbaarheid van de koolhydraten in het behandelde substraat voor verschillende toepassingen. De waarde van het gedelignificeerde materiaal zal onderzocht worden voor herkauwervoeding, co-vergisting voor methaan en vluchtige-vetzuurproductie en de productie van ethanol.

Champost bestaat uit een mengsel van compost en dekaarde dat na de teelt uit de teeltruimten wordt gehaald. Vaak, maar zeker niet altijd is de champost gedurende 8 uur verhit bij 70°C voordat de teeltruimten worden geopend. Straatsma (2006) schat de jaarlijkse productie van champost op ongeveer 910000 ton. Momenteel wordt champost vooral afgezet als meststof/bodemverbeteraar. De hoeveelheid champost die op het land mag worden gebracht wordt beperkt door wettelijke regelingen. De hoeveelheden stikstof en fosfaat in de champost vormen de voornaamste beperkende factoren in het landbouwkundig gebruik van champost. In 2002 is een studie uitgevoerd door Zhu en Van Roestel (2002) naar de mogelijkheden voor hergebruik van champost. Zij concludeerden toendertijd dat gebruik als meststof/bodemverbeteraar het meest perspectiefvol was, maar dat er rekening moest worden gehouden met een lage (of negatieve) verkoopprijs. Een andere beperkende factor in de afzet is het relatief hoge zoutgehalte van champost. Indien een gedeelte van de zouten uit de champost geloofd kunnen worden, is champost beter bruikbaar (Gonani et al, 2011, <http://www.wageningenur.nl/nl/project/Valorisatie-Champost.htm>). Vanwege de beperkingen die de minerale samenstelling van champost oplegt aan de hoeveelheid die per hectare landbouwgrond mag worden verwerkt, is het meeste analyse-werk verricht aan de minerale samenstelling. Straatsma (2006) geeft het volgende overzicht van de samenstelling van champost:

Tabel 1. Tabel. Samenstelling van 25 Nederlandse Champost monsters per jaar uit de jaren 2001, 2002 en 2005 (Straatsma 2006).

Parameter	Eenheid	Gemiddelde	Standaard deviatie	Minimum	Maximum	Aantal monsters	Aantal monsters onder de detectielimiet
Droge stof	g/kg	327	33	245	416	75	
Organische stof	% van droge stof	61	2.5	54.2	65.8	75	
Stikstof in droge stof	g/kg	20.8	1.6	15.9	24.9	74	
Fosfor (P ₂ O ₅)	g/kg	12.1	1.7	7.8	17.0	75	
K ₂ O	g/kg	23.4	4.9	15.5	36.0	74	
Cd	mg/kg	0.27	0.05	0.20	0.41	66	9
Cr	mg/kg	7.5	3.7	3.5	26.0	74	1
Cu	mg/kg	34.1	16.3	17.0	112.0	75	
Hg	mg/kg	0.04	0.01	0.03	0.07	67	8
Ni	mg/kg	4.4	1.3	2.7	12.0	74	1
Pb	mg/kg	7.2	2.0	6.3	16.0	30	45
Zn	mg/kg	135	24	56	192	75	
As	mg/kg	1.8	0.9	1.1	4.3	70	5
EC	mS/cm	13.0	1.9	9.9	18.8	74	
C/N	schatting	10.4	1.2	8.2	14.1	74	

De waarden in bovenstaande tabel komen grotendeels overeen met waarden die in 1994 werden gepubliceerd door Gerrits (1994) over de samenstelling van champost over een 14-jarige periode van 1966 tot 1993 en met de waarden die Gerrits in 1997 publiceerde over de aanwezigheid van meer dan 30 verschillende mineralen in champost zoals gemeten in een ringtest (Gerrits, 1997). De verschillen tussen verschillende batches champost lijken in Nederland relatief klein. In andere landen, waar compost productie veel meer gecentraliseerd dan in Nederland, kunnen de verschillen groter zijn (Szmids & Chong, 1995). Bij interpretatie van de literatuur over de samenstelling van champost (SMS; spent mushroom substrate) dient rekening gehouden te worden met mogelijke afwijkingen van de Nederlandse champost.

Andere toepassingen die Zhu & Van Roes (2002) perspectiefvol toeschrijven aan de productie van biogas door vergisting, hergebruik van champost als substraat bij andere paddenstoelen en, als laatste, extractie van waardevolle componenten uit champost. Zij geven echter geen voorbeeld van mogelijk waardevolle componenten in champost.

Eventueel waardevolle componenten in champost zouden aanwezig kunnen zijn in de organische stof fractie in champost. Gerrits et al. (1967) bestudeerden de samenstelling van compost op verschillende tijdstippen tijdens compostbereiding en teelt van champignons. Zij kwamen tot de conclusie dat tijdens de compostering en pasteurisatie de totale hoeveelheid lignine gelijk blijft, terwijl de hoeveelheid cellulose en hemicellulose snel afneemt. Na enten met champignonmycelium neemt de hoeveelheid lignine snel af, terwijl cellulose en hemicellulose een beetje afnemen. Tijdens het composteren wordt oplosbaar stikstof omgezet in onoplosbaar stikstof (inbouw thermofiele microflora en incorporatie in een stikstofrijke ligninehumuscomplex). Tijdens de teelt consumeert de champignon de microorganismen en het complex. Aan het eind van de teelt vonden zij op basis van 4 experimenten globaal de volgende samenstelling van de resterende compost; asgehalte tussen 28.6 en 44.2% DM, wateroplosbare componenten tussen 30.5 en 34.4% DM, lignine gehalte tussen 16.5 en 20.4% DM, hemicellulose gehalte tussen 3 en 11.6% DM en cellulose gehalte tussen 6.1 en 18% DM. Voorbereiding van de vier composten werden 2 verschillende recepturen gebruikt, hetgeen mede een verklaring voor de grote variatie in de waarden geeft.

In een latere studie richtte Gerrits (1969) zich op de organische bestanddelen van de compost tijdens de compostkolonisatie en de fructificatie. Hij kwam tot de conclusie dat het grootste deel van de lignine (63-92% van de geconsumeerde lignine) tijdens de compostkolonisatie werd afgebroken. De cellulose en hemicellulose werden tijdens de compostkolonisatie slechts weinig afgebroken, en vooral tijdens de vruchtlichaamvorming. Aan het eind van de teelt vond hij op basis van 4 experimenten globaal de volgende samenstelling van de resterende compost; asgehalte tussen 31.6 en 55.8% DM, wateroplosbare componenten tussen 30.2 en 32.5% DM, lignine gehalte tussen 13.7 en 24.6% DM, hemicellulose gehalte tussen 1.9 en 7.3% DM en cellulose gehalte tussen 5.2 en 12.1% DM. Voor de bereiding van de vier composten werden 2 verschillende recepturen gebruikt, hetgeen mede een verklaring voor de grote variatie in de waarden geeft.

Iiyama et al (1994) beschreven experimenten waarin de samenstelling van een Australische champignoncompost werd bepaald op verschillende momenten tijdens de compostbereiding en de teelt van champignons. Na 4 vluchten werd daarin ook de champost geanalyseerd. In deze champost werd een lignine gehalte van 23.5% DM (32.5% OM) gevonden. Nadat gemakkelijk oplosbare stoffen uit de champost waren geëxtraheerd, werd het residu met zuur gehydrolyseerd om de samenstellende suikers te bepalen. In de vezelfractie van de champost werd voornamelijk glucose (10.1% van het organisch materiaal), xylose (3.6%), arabinose (0.8%), mannose en galactose (ieder 0.4%) gevonden.

Chen et al (2000) bestudeerden bij Penn State University (VS) een compost gebaseerd op 6-8 ton paardemest, 135 kg kippemest, 135 kg gips en 135 kg bierbostel. Zij analyseerden tijdens de teelt gedurende 4 vluchten na elke vlucht de samenstelling van de compost. Na de derde vlucht bevatte de compost nog 55% organische stof en na de vierde vlucht was dat gedaald tot 53.3%. Compost monsters werden met 2 N zwavelzuur gehydrolyseerd om de suikersamenstelling te analyseren. Na hydrolyse vonden ze na de derde vlucht ongeveer 25 µg aan suikers per mg droge stof. In de compost werden glucose (8-9 µg/g DM), fucose en arabinose (samen ong. 7-9 µg/g DM), mannose (4-5 µg/g DM), galactose (3-4 µg/g DM) en rhamnose (ong. 2 µg/g DM) aangetoond. Alles tezamen vertegenwoordigden deze suikers ongeveer 4-5% van de totale organische stof.

In een door het Productschap Tuinbouw gefinancierd project is in 2010-2011, gebruikmakend van CNC compost een teelt uitgevoerd waarin 2 vluchten champignons werden geoogst. De champost die na deze twee vluchten resteerde, werd m.b.v. NIR-spectroscopie een schatting gemaakt van de samenstelling (Tabel 2).

Tabel 2. Samenstelling van champost uit 2010 na productie van 2 vluchten champignons op CNC compost (op basis van NIR-spectrometrie).

Parameter	Kg/ton
Droge stof	359,5
As	137.8
Organische stof	221.7
Lignine	55.9
Cellulose	53.8
Hemicellulose	3.7
Wateroplosbaar	108.3

Het in de champost resterende cellulose en hemicellulose wordt door lignine afgeschermd tegen afbraak (Tak Have et al., 2003). Bij hergebruik van champost als substraat voor andere eetbare paddenstoelen, zal de paddenstoelsoort in staat moeten zijn om de cellulose en hemicellulose in de champost af te breken. Dit basidiomyceten zouden daar mogelijk in staat zijn. Er zijn echter geen publicaties bekend waarin een succesvolle teelt met champost als (de)substraat is beschreven.

In het in dit rapport beschreven project wordt onderzocht of witte schimmels in staat zijn om de resterende holocellulose in champost verder beschikbaar te maken voor gebruik in de *biobased economy*.

3. Testen van schimmelgroei op champost

3.1 Gebruikte champost

Champost werd aangeleverd door Emons Recycling Logistics in Milsbeek (Figuur 1). Bij aankomst in het lab werd de champost gedroogd bij 70°C, vernalen tot fragmenten van ongeveer 2-4 mm en droog bewaard tot gebruik.



Figuur 1. De champost zoals aangeleverd voor gebruik in het project.

3.2 Gebruikte schimmelstammen

Een overzicht van de schimmelsoorten die geselecteerd werden voor groei op champost wordt gegeven in Tabel 3. De schimmels werden voor de experimenten uit de collectie in vloeibare stikstof gehaald en ontdooid. Vervolgens werden de schimmelkolonies in stand gehouden op mout-extract/ mycologisch pepton tot gebruik. Niet alle geselecteerde schimmels zijn hout-afbrekende witrotschimmels. *Lepista nuda* (de Paarse Schijnridderzwam) is bijvoorbeeld een saprofytische schimmel.

Tabel 3. Overzicht van de 11 schimmelsoorten die geselecteerd werden voor het testen van groei op champost.

Nr.	Collectie-nummer	Soort	Opmerkingen
1	MES 11937	<i>Clitocybula duseinii</i>	= DSM-11238
2	MES 11922	<i>Trametes suaveolens</i>	= CCBAS611
3	MES 03464	<i>Pleurotus sajorajju</i>	= Amycel 3011, commercieel verkrijgbare stam
4	MES 02055	<i>Trametes versicolor</i>	= Wild isolaat, onbekende oorsprong
5	MES 11908	<i>Gymnopilus sapineus</i>	= CCBAS372
6	MES 11919	<i>Bjerkandera adusta</i>	= CCBAS930
7	MES 11856	<i>Stropharia rugosæannulata</i>	= SR11, isolaat uit Duitsland (Dr. Egbert Seibertz)
8	MES 11910	<i>Lentinula edodes</i>	= CCBAS389
9	MES 03412	<i>Pleurotus eryngii</i>	= Somycel 3060, commerciële stam
10	MES 13094	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	= CBS 347.63, isolaat uit de VS
11	MES 03218	<i>Lepista nuda</i>	= Wild isolaat, gevonden in "de Rosmolen" Geysteren

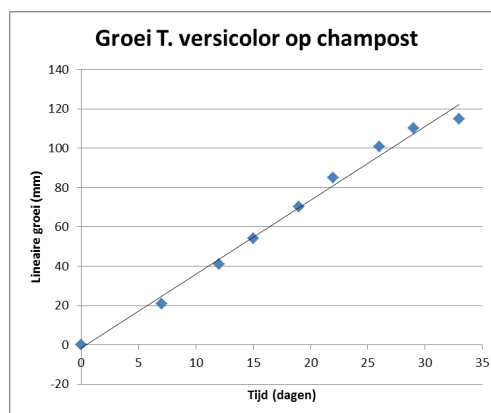
3.3 Geteste substraten

3.3.1 Groei op champost

Alle schimmels in Tabel 3 werden getest op hun vermogen om te groeien op champost. Groei op champost werd gemeten als lineaire groeisnelheid in een glazen buis (21 mm). Hiervoor werd de champost gerehydrateerd en vervolgens werd in elke buis eenzelfde gewicht aan champost afgevuld tot dezelfde vulhoogte. Hierdoor werd in elke buis dezelfde buisdensiteit van het substraat bereikt. Na sterilisatie (2 maal 1 uur op 121°C om hiteresistente sporen af te doden) werd het substraat bent met 5 entpuntjes. Entpuntjes werden genomen uit een groeiende kolonie met een steriele krukboor van 5 mm doorsnede. De buizen werden vervolgens bij 24°C geïncubeerd in een warme kamer bij een RV van 70%. Groei van het mycelium werd elke 2 tot 3 dagen vastgelegd op 4 assen langs de lengterichting van de buis voor een periode tot maximaal 62 dagen. De myceliumgroei werd gevolgd over de volledige lengte van de champostkolom (12 cm). Voor elke schimmel werd groei op 3 buizen gevolgd.

Nadat de buizen volledig doorgroeid waren werd de kolonisatie op verschillende tijdstippen afgebroken; meteen bij het bereiken van de bodem van de buis, 2 weken na het bereiken van de bodem van de buis en 4 weken na het bereiken van de bodem van de buis. De op deze manier met nieuwe schimmel gekoloniseerde champost werd gedroogd bij 70°C en bewaard voor verdere analyse.

Van de 11 geteste schimmels bleken alleen *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajorajju*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*, *Clitocybula dussenii*, *Gymnopilus sapineus* en *Bjerkandera adusta* in staat te zijn om champost te koloniseren. *Stropharia rugoseannulata*, *Lentinula edodes*, *Ceriporiopsis subvermispora* en *Lepista nuda* vertoonden slechte groei. Figuur 2 toont als voorbeeld de lineaire groei van *Trametes versicolor* op gesteriliseerde champost. Na een lag-fase van een aantal dagen vertoont de schimmel een mooie lineaire groeisnelheid. Deze houdt aan totdat na 25 dagen de champost over een afstand van 100 mm is gekoloniseerd. Vervolgens neemt de groeisnelheid af, hetgeen waarschijnlijk te wijten is aan het feit dat de champostlaag in de buis slechts 120 mm diep was en het lineaire stuk van de grafiek kan de maximale groeisnelheid van het mycelium worden berekend.



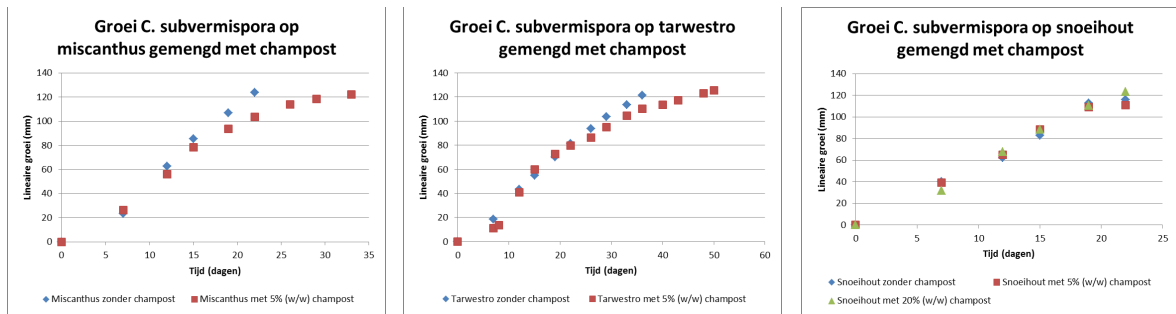
Figuur 2. Lineaire groei van *Trametes versicolor* op gesteriliseerde champost bij 24°C.

Tabel 4. Lineaire groeisnelheden van de geteste schimmelstammen op champost.

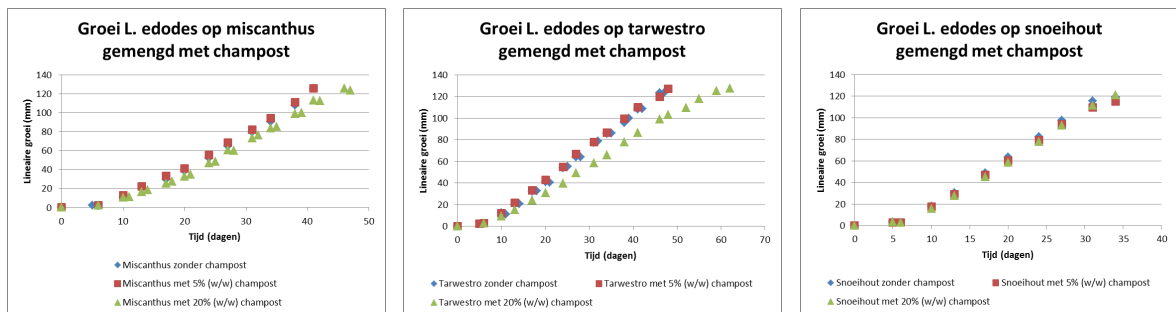
Schimmelsoort	Stam	Maximale lineaire groeisnelheid (mm/dag)
<i>Trametes suaveolens</i>	MES 11922	7.1
<i>Pleurotus sajorajju</i>	MES 03464	5.3
<i>Trametes versicolor</i>	MES 02055	4.3
<i>Pleurotus eryngii</i>	MES 03412	4.2
<i>Bjerkandera adusta</i>	MES 11919	3.9
<i>Clitocybula dussenii</i>	MES 11937	3.0
<i>Gymnopilus sapineus</i>	MES 11908	2.0
<i>Stropharia rugoseannulata</i>	MES 11856	0
<i>Lentinula edodes</i>	MES 11910	0
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MES 13094	0
<i>Lepista nuda</i>	MES 03218	0

3.3.2 Groei op mengsels van champost

De schimmels *C. subvermispora* en *L. edodes* bleken niet in staat om op champost te groeien. Deze beide schimmels bleken echter in de overige experimenten binnen SATW gefinancierde project op andere lignocellulose houdende substraten zeer interessant. Om die reden is hun groei nogmaals getest, echter in dit geval op mengsels van champost met andere lignocellulose bronnen. Figuur 3 laat zien dat bij groei op Miscanthus en tarwestro het toevoegen van 5% (w/w) champost aan het substraat reeds een vermindering van de lineaire groeisnelheid tot gevolg heeft. Daar staat tegenover dat bij groei op snoeihout zelfs het toevoegen van 20% champost geen remming op de lineaire groeisnelheid geeft. Bij *Lentinula edodes* heeft toevoegen van 5% champost aan een substraat van Miscanthus weinig effect op de groeisnelheid. Toevoeging van grotere hoeveelheden champost geeft een lichte remming van de lineaire groeisnelheid. Bij groei van *L. edodes* op tarwestro wordt een vergelijkbaar beeld gezien, zij het dat toevoeging van 20% champost aan het substraat een iets sterkere remming van de groeisnelheid tot



Figuur 4. Groei van *Ceriporiopsis subvermispora* op verschillende lignocellulose houdende substraten, gemengd met champost.



Figuur 4. Groei van *Lentinula edodes* op verschillende lignocellulose-houdende substraten gemengd met champost.

gevolg heeft. Bij groei van *L. edodes* op snoeihout heeft zelfs het toevoegen van 20% champost geen effect op de groeisnelheid van de schimmel.

3.4 Discussie

Samenvattend kan gezegd worden dat typische witrot-schimmels zoals *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajorajau*, *Trametes suaveolens*, *Trametes versicolor*, *Clitocybula duseñii*, *Gymnopilus sapineus* en *Bjerkandera adusta* in staat zijn om uit (gesteriliseerde) champost nog voldoende voeding te halen om te kunnen groeien. De witrotters *Lentinula edodes* en *Ceriporiopsis subvermispora* en de schimmels *Stropharia rugoseannulata* en *Lepista nudata* bleken niet in staat te groeien op champost. De gebruikte stammen van *L. edodes* en *C. subvermispora* bleken prima in staat om te groeien op miscanthus, tarwestro en houtsnippers. Toevoeging van champost had een remmend effect op de lineaire groeisnelheid en dat suggereert ofwel een tekort aan voedingsstoffen of de aanwezigheid van een remmende factor in de champost.

Ter nuancering van de relatief hoge lineaire groeisnelheden van de witrotschimmels bij groei op uitsluitend champost, moet worden opgemerkt dat een lineaire groeisnelheid niet gelijkstaat aan een goede vorming van biomassa. Ter illustratie, in October 1999 is een teeltproef (proefnummer 22815) uitgevoerd waarin oesterzwam (*Pleurotus ostreatus* ras HK35) werd geteeld op mengsels van stro en champost. Hierbij werd gewerkt met mengsels van:

- 0% champost / 100% nat stro
- 25% champost / 75% nat stro
- 50% champost / 50% nat stro

Bij aanlevering van de grondstoffen werd bemonsterd en werd geanalyseerd op vochtgehalte, pH, ammonium-N, totaal N en asgehalte. Het stro had een asgehalte van 10% terwijl de champost een asgehalte van bijna 40% had. Na grondig mengen van de grondstofmengsels werd gepasteuriseerd bij 70°C gedurende 10 uur. Vervolgens werd gedurende 4 dagen geconditioneerd bij 45°C. Het substraat werd geënt met ras HK-35 (25 liter/ton substraat) en in pakketten geperst. Vervolgens werden de pakketten gedurende geïncubeerd in teeltcellen. In de controle (0% champost/100%stro) liep de temperatuur van het substraat op tot een temperatuur van 32°C. Om oververhitting te voorkomen werd de luchttemperatuur in de teeltcel verlaagd van 24 °C naar 20°C. Na 6 dagen zag het substraat

met 0% champost er goed doorgroeit uit. In het substraat met 25% champost groeit het mycelium moeizaam. In substraat met 50% champost groeit het mycelium niet echt van de entpuntjes (=broedkorrels) af. Aan het einde van de substraatkolonisatie (na 17 dagen) zagen alle substraten er echter goed doorgroeit uit. Na een substraatkolonisatie van 17 dagen werd afgeventileerd. De luchttemperatuur werd daarbij in enkele dagen verlaagd naar 16 °C, een RV van 96% en een CO₂ gehalte van 680 ppm. Bij het substraat met 0% champost waren op dat moment de eerste knopjes met jonge paddenstoelen al zichtbaar. Al na 6 dagen na afventileren begint de oogst. De opbrengsten (Tabel 5) werden bepaald inclusief de voetjes (het afval).

Tabel 5. Productie aan oesterzwammen op tarwestro-substraat, gemengd met verschillende hoeveelheden champost.

Substraatmengsel	# pakketten	Gemiddelde opbrengst aan oesterzwammen per pakket (kg)	Standaard deviatie
0% champost	21	23.9	2.9
25% champost	21	23.5	2.4
50% champost	21	13.1	2.1

Variantieanalyse gaf aan dat op het mengsel met 25% champost evenveel is geproduceerd als in de controle met 0% champost. Opbrengst op een mengsel met 50% champost ligt 45% lager. De oesterzwammen van substraatmengsel met 0% champost hadden een normale kwaliteit. Bij de substraatmengsels die wel champost bevatten, waren er duidelijke kwaliteitsproblemen; slechte uitgroei van de paddenstoelen, oververkleuring of afsterven van trossen met paddenstoelen. Na het oogsten van 3 vluchten paddenstoelen werd het substraat weer geanalyseerd. Bij 0 en 25% champost in het tarwestro-substraat was de pH (o.a. een maat voor de doorgroeiing met mycelium) gedaald tot 4.9. Bij 50% champost was de pH gedaald tot 5.2. Daarnaast bleek in het tarwestro-substraat de hoeveelheid droge stof met 22% te zijn gedaald. In het substraat met 25% en 50% champost was respectievelijk 16 en 12% van de droge stof verdwenen. We mogen aannemen dat de verdwenen droge stof in principe nagenoeg volledig uit organische stof bestaat.

Het toevoegen van champost aan substraat voor oesterzwammen (*Pleurotus ostreatus*) een bijzonder nauwe verwant van *Pleurotus sajorajua* had dus tot gevolg dat in een pakket met substraat minder voedsel aanwezig was voor het maken van paddenstoelen (verminderde opbrengst en kwaliteit).

4. Toegankelijkheid cellulose en hemicellulose na behandeling van champost met schimmels

4.1 Effect doorgroeiing van champost met witrot schimmels op het lignine -gehalte.

Zoals beschreven in § 2.3.1. bleek het mogelijk om steriele champost in volgorde van afnemende groeisnelheid te laten doorgroeien door *Trametes suaveolens*, *Pleurotus sajor-caju*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii*, *Bjerkandera adusta*, *Clitocybe duseña* en *Gymnopilus sapineus*. Met uitzondering van *G. sapineus* werden de doorgroeide champost monsters geanalyseerd op acid detergent Lignin (ADL) gehalte. Tabel 6 geeft een overzicht van de ligninegehalten na volledige doorgroeiing van de champost met witrotschimmels. Daarnaast is in de Tabel ook de lineaire groeisnelheid van de verschillende schimmelsoorten aangegeven. *Pleurotus eryngii* en *Pleurotus sajor-caju* bleken het beste in staat om het ligninegehalte in de champost te verlagen. De beide *Trametes*soorten bleken slechts beperkt in staat om het ligninegehalte te verlagen. Een hoge lineaire groeisnelheid in champost blijkt dit geen indicator te zijn van verregaande afbraak van lignine.

Tabel 6. Effect van het doorgroeien van champost met witrot-schimmels op het ligninegehalte (gemeten als Acid Detergent Lignin, ADL)

Schimmelsoort	Lineaire groeisnelheid (mm/dag)	Lignine-gehalte (% ADL)	standaard deviatie	n
Niet met witrot-schimmel doorgroeide champost	n.v.t.	31.6		1
<i>Trametes suaveolens</i>	7.1	30.8	3.0	3
<i>Trametes versicolor</i>	4.3	27.9	2.3	3
<i>Bjerkandera adusta</i>	3.9	27.9	0.9	3
<i>Clitocybe duseña</i>	3	24.6	1.6	3
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	5.3	24.0	0.9	3
<i>Pleurotus eryngii</i>	4.2	21.0	1.7	3

4.2 Vermogen van witrot -schimmels om cellulose in champost beschikbaar te maken voor enzymatische afbraak.

Om te achterhalen in hoeverre de behandeling met witrot-schimmels het resterende cellulose en hemicellulose in champost beschikbaar maakt voor enzymatische afbraak, werd gebruik gemaakt van een modelsysteem voor het vaststellen van de verteerbaarheid van lignocellulose in de pens. De micro-organismen in de pens zijn specialisten in het afbreken van cellulose in de celwanden van planten. Ze zijn echter niet in staat om lignine af te breken in de zuurstofloze atmosfeer in de pens. Als er meer koolhydraten beschikbaar zijn, zullen de pens-micro-organismen meer substraat afbreken met als gevolg een verhoogde productie van vluchtige vetzuren en CO₂ en methaan (biogas). De toegankelijkheid van cellulose voor de enzymen van de pens-microorganismen laat zich daardoor aflezen aan de hand van de hoeveelheid biogas die geproduceerd wordt (Cone et al., 1996).

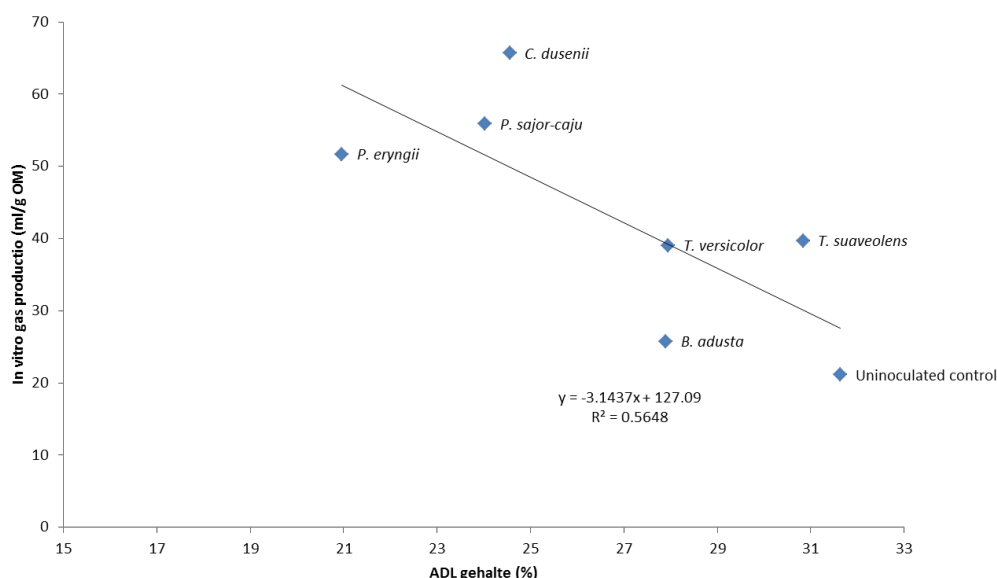
Tabel 7 toont de gemiddelde biogasproductie als champost doorgroeit met witrotschimmels wordt aangeboden aan pensmicroorganismen. Hoe hoger de biogasproductie, hoe beter het cellulose in het monster

toegankelijk is voor de cellulose-afbrekende enzymen in de pens. Zonder schimmelbehandeling zijn de pensmicroorganismen slechts tot een erg lage gasproductie in staat (21.1 ml per gram organische stof). Ter vergelijking; op basis van tarwestro en snoeihout zijn de pens-microorganismen in staat om respectievelijk ongeveer 200 ml en ongeveer 85 ml gas te produceren per gram organische stof. Doorgroei van de champost met *Clitocybula duseinii*, *Pleurotus sajor-caju* en *Pleurotus eryngii* verhoogt de gasproductie tot respectievelijk 65.7, 55.9 en 51.7 ml/gram organische stof. Dat is echter nog altijd aanzienlijk minder dan de gasproductie door onbehandeld snoeihout.

Tabel 7. Biogasproductie door pens-microorganismen gevoed met champost doorgroeid met witrotschimmels als maat voor de toegankelijkheid van de cellulose in de champost.

Schimmel	Gasproductie (in ml/gram organische stof)	Std. Dev	n
<i>Clitocybula duseinii</i>	65.7	0.7	3
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	55.9	17.7	3
<i>Pleurotus eryngii</i>	51.7	4.1	3
<i>Trametes suaveolens</i>	39.7	6.1	3
<i>Trametes versicolor</i>	39.2	4.9	3
<i>Bjerkandera adusta</i>	25.8	6.8	3
Onbehandelde champost	21.1	0.0	1

Er lijkt overigens een relatie te bestaan tussen het lignine gehalte van de champost (uitgedrukt als % ADL) en de in vitro gas productie. Hoe lager het ligninegehalte, hoe hoger de gasproductie. Dit lijkt de hypothese te ondersteunen dat het cellulose wordt afgeschermd tegen enzymatische afbraak door het lignine in het substraat.



Figuur 5. Relatie tussen lignine-gehalte in de behandelde champost (uitgedrukt als Acid Detergent Lignin (% ADL) en de productie van biogas uit deze champost.

4.3 Discussie

Bovenstaande experimenten laten zien dat de verschillende witrotschimmels die kunnen groeien op champost in verschillende mate in staat zijn om het ligninegehalte (gemeten als Acid Detergent Lignin) te verlagen. Het lijkt er daarnaast op dat met een verlaging van het ligninegehalte de resterende holocellulose in de champost beter

toegankelijk wordt voor enzymen die het cellulose en hemicellulose afbreken. Ten opzichte van onbehandelde champost wordt de hoeveelheid suikers (afgeleid uit de geproduceerde hoeveelheid biogas) die door enzymen uit champost kan worden vrijgemaakt ruimschoots verdubbeld. Echter, zelfs na behandeling met witrot-schimmels blijft de hoeveelheid suikers die uit champost kan worden ver achter bij de hoeveelheid suikers die kan worden vrijgemaakt uit tarwestro of zelfs snoeihout. Voor een bio-based toepassing waarin champost gesaccharificeerd moet worden lijkt het geen bijzonder interessante grondstof.

De samenstelling van champost wordt gegeven in Tabel 8. Volgens deze analyse (op basis van NDF, ADF en ADL) bevat een kilo champost op droge stof basis ongeveer 13 gram hemicellulose en 155 gram cellulose. Dat komt neer op 21 gram hemicellulose en 250 gram cellulose = 271 gram suikers per kg organische stof. Ter vergelijking; tarwestro bevat in de orde van grootte van 308 g hemicellulose en 477 gram cellulose per kg organische stof. Dat komt neer op 785 gram suikers per kg organische stof en levert een gasproductie van ongeveer 200 ml/gram organische stof (Tuyen et al., 2012). Hoewel de hoeveelheid suikers in champost slechts ongeveer een factor 3 lager ligt dan in tarwestro, ligt de gasproductie een factor 10 lager. Na doorgroeiing van de champost met schimmels zoals *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajorajua* of *Clitocybula dusenii* ligt de gasproductie op 50-60 ml/gram organische stof. In vergelijking met tarwestro ligt de gasproductie uit witrot-schimmel doorgroeide champost een factor 3-4 lager dan bij tarwestro. De efficiëntie waarmee suikers uit tarwestro en de suikers uit witrot-schimmel doorgroeide champost worden omgezet ligt daarmee ongeveer gelijk.

Tabel 8. Samenstelling champost zoals afgeleid uit de meetgegevens van Sonnenberg & Blok (2012)

	Droge stof	As	Organische stof	cellulose	hemicellulose	lignine
	kg	kg	kg	kg	kg	kg
Proef 1	1	0.385	0.615	0.161	0.015	0.142
Proef 2	1	0.383	0.617	0.149	0.011	0.156
Gemiddeld	1	0.384	0.616	0.155	0.013	0.149

Kim et al. (2011) hebben in Zuid-Korea de bruikbaarheid van champost als veevoeder onderzocht. De champost die zij voor hun onderzoek gebruikten was gebaseerd op een compost op basis van een grondstoffenmengsel met 80% rijststro, 14% slachtkuikensmest, 2% ureum en 4% calciumcarbonaat. Na de teelt van champignons werd de dekaardelaag verwijderd en uit de resterende champost werden de rijststrodelen verzameld. Deze werden gedroogd en gemalen tot kleine deeltjes (100 µm-2 mm) en gebruikt voor een test waarbij de rijstrodelen uit de champost in de pens van een koe werden gebracht. Hiervoor werd een zakje (Dacron R1020, Ankom Technology, NY, USA, afmeting 10×25 cm; poriën grootte in de zak 50±15 µm) gebruikt met ongeveer 10 g rijstrodelen afkomstig uit champost. Het zakje werd middels een canule in de pens gebracht en daar na enige tijd (maximaal 72 uur) weer uitgehaald. Na het verblijf in de pens werd gekeken naar het verlies aan droge stof, NDF, ruw eiwit enz. Het ruw eiwit gehalte wordt berekend door het stikstofgehalte te vermenigvuldigen met een factor 6.22. Er wordt daarbij geen rekening gehouden dat een flink deel van het stikstof in schimmels niet in de vorm van eiwit, maar bijvoorbeeld in de vorm van chitine aanwezig is.

In vergelijking met gewoon rijststro, liet het rijststro dat uit de champost afkomstig was tijdens het verblijf in de pens enerzijds een groter verlies aan droge stof of ruw eiwit zien en anderzijds een lager verlies aan NDF. Dat is te verklaren doordat het champignonmycelium al een flink deel van het NDF (de vezelfractie waarin cellulose + hemicellulose + lignine aanwezig zijn) heeft geconsumeerd waardoor het voor de pens-microorganismen niet meer beschikbaar is. Het ruw eiwit in het rijststro uit de champost is voor een groot deel afkomstig uit het eiwit en de chitine van het champignonmycelium en wordt door de pens micro-organismen gemakkelijk afgebroken.

Als we met deze kennis kijken naar de biogasproductie in Figuur 5, dan zien we dat de biogasproductie op basis van champost op ongeveer 20 ml/gram organische stof ligt. Na doorgroeiing van de champost met schimmels zoals *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajorajua* of *Clitocybula dusenii* ligt de gasproductie op 50-60 ml/gram organische stof. Een deel van deze toename in biogasproductie zou wel eens het gevolg kunnen zijn van de aanwezigheid van het extra schimmelmateriaal als gevolg van de kolonisatie door bovengenoemde schimmels en slechts in mindere mate het gevolg kunnen zijn van het vrijmaken van extra koolhydraten.

5. Champost als bron van enzymen

Om suikers te kunnen vrijmaken uit lignocellulose-houdend materiaal zijn enzymen nodig en deze enzymen zijn in ruime mate aanwezig in een niet-doodgestoomde champost (Ayala et al., 2011). Om die reden is onderzocht of enzym-extract uit champost in staat is om suikers vrij te maken uit lignocellulose-houdend substraat.

5.1 Maken van een enzymextract.

Champost (250 gram) werd gemengd met 375 ml natriumcitraat buffer (50 mM, pH 5.3) en gedurende 30 minuten op 230 rpm geschud op een rotary shaker bij kamertemperatuur. De mix werd gefiltreerd over een dubbele laag kaasdoek en het filtraat is gecentrifugeerd om te zorgen dat er geen vaste deeltjes meer in het extract zitten. Om te kijken hoeveel eiwit geëxtraheerd is, is er een BCA bepaling (Thermo Scientific Pierce BCA protein reagent kit) gedaan op het extract. Hiermee is vast gesteld dat er 4 mg/ml eiwit in het extract zit. Dit zijn niet alleen enzymen, maar kunnen ook andere eiwitten zijn.

5.2 Bepalen van de enzymactiviteit

Voor het vaststellen van de enzymactiviteit is gebruik gemaakt van geautoclaveerd tarwestro dat niet met witrot schimmels werd behandeld en tarwestro dat gedurende 8 weken werd doorgroeid met *L. edodes* of *C. subvermispora*. Dit tarwestro is gedroogd bij 70°C en gemalen (1 mm) voorafgaand aan de enzym activiteit bepalingen. Aan 2 gram biomassa is 4 ml champost extract (4 mg/ml = 16 mg eiwit) en 16 ml natriumcitraat buffer (50 mM, pH 5.3) toegevoegd. Bij de controle is 20 ml natriumcitraat buff (50 mM, pH 5.3) toegevoegd aan 2 gram biomassa om uit te sluiten dat de biomassa nog een restant enzymen bevat.

Na 0, 4, 8, 12, 24, 48 en 72 uur zijn monsters genomen van het reactiemengsel en deze zijn geanalyseerd op aanwezigheid van glucose met de D-glucose (GOPOD) kit (Gluco 07/11) van megazyme. Voor een schatting van de cellulase activiteit in het enzym extract is de hoeveelheid vrijgemaakte glucose bepaald. Cellulase activiteit is uitgedrukt als mg vrijgemaakte glucose per gram biomassa. Voor een schatting van hemicellulase activiteit in het enzym extract is de hoeveelheid vrijgemaakte xylose bepaald met behulp van de xylose kit (Xylose 11/12) van megazyme. Hemicellulase activiteit is uitgedrukt als mg vrijgemaakte xylose per gram hemicellulose biomassa. De samenstelling van de substraten voor de bepaling van de enzymactiviteit is afgeleid uit de resultaten van de analyse met de Van Soest methode (Tabel 9).

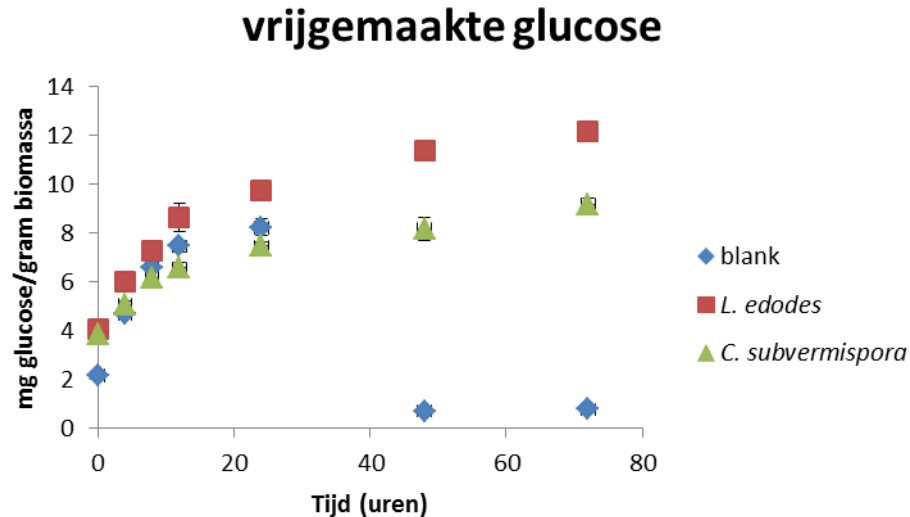
Tabel 9. Samenstelling van tarwestro en tarwestro dat 8 weken doorgroeit met *Lentinula edodes* of *Ceriporiopsis subvermispora*.

Component (g/kg droge stof)	Onbehandeld	<i>L. edodes</i>	<i>C. subvermispora</i>
Cellulose	440.3	518.6	490.2
Hemicellulose	321.5	132.8	87.2
Lignine (ADL ¹)	75.3	29.4	17.4

¹ ligninegehalte is bepaald door middel van de acid detergent lignin (= ADL) bepaling

5.2.1 Cellulase activiteit

De resultaten van een analyse op cellulase activiteit worden weergegeven in Figuur 6. In onze experimenten bleken de enzymen uit de champost in staat om slechts 8 tot 12 mg glucose vrij te maken uit de 440-520 mg cellulose die in het substraat aanwezig was. Dat is slechts 2% van het in potentie aanwezige glucose in het substraat. Het is vermoedelijk dat dit omdat dan alle toegankelijke cellulose op is en de schimmel ruimte moet creëren om bij de overige cellulose te komen of uit andere suikers (zoals hemicellulose) zijn energie moet halen.

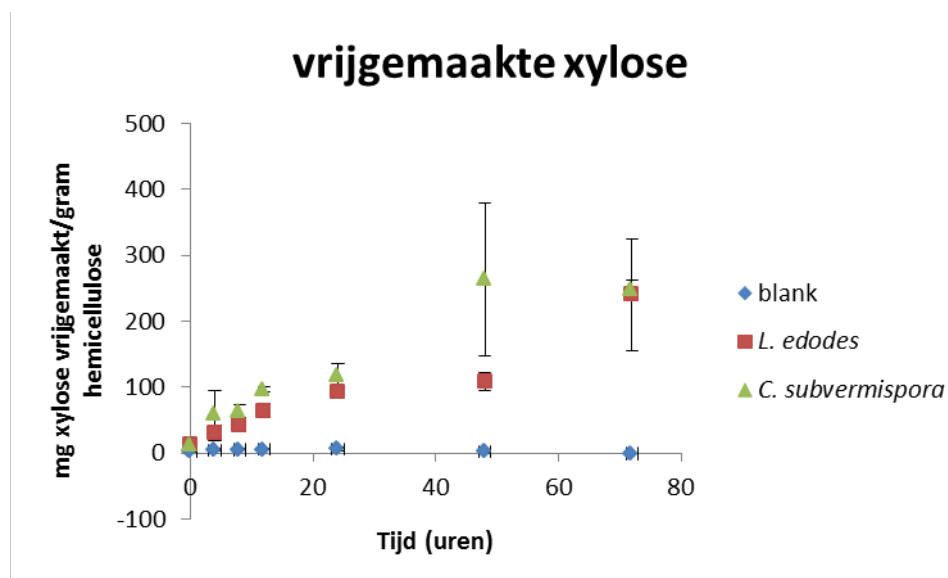


Figuur 6. Vrijmaking van glucose uit tarwestro, al dan niet behandeld met de witrot-schimmels *Lentinula edodes* of *Ceriporiopsis subvermispora*. Blank = niet behandeld tarwestro.

Patyshakuliyeva en collega's (2015) laten zien dat er na de productie van 2 vluchten champignons nog ruime cellulase activiteit in de compost aanwezig is. Echter, hun enzymbepaling maakt gebruik van het zeer goed oplosbare carboxy-methyl-cellulose als substraat. Het cellulose in tarwestro (zoals dat in onze enzymtest is gebruikt) is niet oplosbaar en beschermd door lignine en hemicellulose. Waarschijnlijk zit daar het grote verschil tussen haar resultaten en de hier gepresenteerde resultaten.

5.2.2 Hemicellulase activiteit

De resultaten van een analyse op hemicellulase (= xylanase) activiteit worden weergegeven in Figuur 7. De xylanases in het extract uit champost zijn niet in staat om xylose vrij te maken uit het onbehandelde tarwestro.. In schimmelbehandeld tarwestro daarentegen kunnen de enzymen in het extract uit champost wel zorgen voor het vrijmaken van xylose uit hemicellulose. De resultaten zijn uitgedrukt per gram hemicellulose in het tarwestro. De



Figuur 7. Vrijmaking van xylose uit tarwestro, al dan niet behandeld met de withrot-schimmels *Lentinula edodes* of *Ceriporiopsis subvermispora*. Blank = niet behandeld tarwestro.

totale hoeveelheid hemicellulose in schimmelbehandeld tarwestro is lager dan in onbehandeld tarwestro (Tabel 9), maar de hemicellulose die nog aanwezig is, is wel beter beschikbaar voor enzymen in champost extract. Naast hemicellulose hebben *L. edodes* en *C. subvermispora* voornamelijk lignine afgebroken. Daarom lijkt het erop dat de enzymen in champost extract alleen de hemicellulose kunnen afbreken naar xylose wanneer er geen lignine meer in de weg zit. Het is belangrijk om te melden dat hemicellulose niet alleen uit ~~xylose~~ maar ook uit andere ~~suikers~~ ^{C5} suikers zoals arabinose, mannose, galactose of rhamnose bestaat. Deze suikers zijn hier niet gemeten, maar er is gekozen om xylose als maat voor hemicellulose afbraak door enzymen te nemen. ~~Ca. 85% van de C5 suikers in hemicellulose van tarwestro is xylose (Jurak, thesis 2015)~~ Daarnaast is de bepaling van totale hemicellulose met de Van Soest methode totaal anders dan de bepaling van vrije xylose. Vergelijkingen tussen hemicellulose gehalte en xylose gehalte moeten daarom voorzichtig gemaakt worden. Het zou beter zijn om het substraat volledig te hydrolyseren, dan de totale hoeveelheid xylose te meten in het materiaal en dit te vergelijken met vrijgemaakte ~~xylose~~ na incubatie met enzymen.

Jurak en collega's (2015) onderzochten de afbraak van in compost aanwezige hemicellulose door champignon. Zij kwamen tot de conclusie dat champignon niet in staat was om hemicellulose volledig af te breken. Hemicellulose tarwestro heeft een veel complexere structuur dan cellulose en is voornamelijk opgebouwd uit ketens van de suiker xylose met korte zijketens van de suiker arabinose en glucuronzuur. Daarnaast zitten er op sommige plekken nog kleine acetylgroepen aan het xylose en glucuronzuur aan het arabinose. Jurak en collega's kwamen tot de conclusie dat champignon niet in staat was om de gedeelten van het hemicellulose af te breken waar de arabinose groepen en het glucuronzuur aan het hemicellulose gebonden zijn. Een volledige afbraak van hemicellulose uit tarwestro is daardoor niet mogelijk. Dit beperkt uiteraard de bruikbaarheid van het enzymextract.

5.3 Discussie

De resultaten van de extractie van enzymen uit champost laat zien dat slechts weinig bruikbare cellulase activiteit in champost aanwezig is, maar dat deze enzymen moeite hebben om cellulose in onopgeloste vorm af te breken. Dit beperkt de mogelijkheden voor gebruik. De enzymen uit champost vertonen een aanzienlijk grotere hemicellulase activiteit. Echter, literatuuronderzoek leert dat deze enzymen niet in staat zijn om hemicellulose dat zijketens van arabinose en glucuronzuur bevat af te breken.

Enzympreparaten met cellulase of hemicellulase worden tegenwoordig tegen vrij lage kosten op de markt aangeboden. Er worden hogere prijzen gevraagd voor enzymen met bijzondere specificiteiten. In dat licht is het de vraag of enzymen die geëxtraheerd worden uit champost enige toegevoegde waarde op de markt zullen vertonen.

6. Champost als substraat component in de teelt van koningsoesterzwam (*Pleurotus eryngii*)

Zoals aangetoond in hoofdstuk 3, is *Pleurotus eryngii* goed in staat om de lignine fractie in champost te verlagen (Tabel 6) en daardoor de toegankelijkheid van resterende voedingsstoffen in de champost te verhogen (Tabel 7). Om deze reden is een experiment uitgevoerd waarin champost is gebruikt als substraat component voor de teelt van *Pleurotus eryngii*. Normaliter wordt *Pleurotus eryngii* geteeld op een substraat dat is samengesteld uit zaagsel, een voedingssupplement en water. Dit substraat wordt gepasteuriseerd bij ongeveer 100°C en na afkoelen wordt met broed van *Pleurotus eryngii*. Vervolgens wordt het beente substraat in 3 kg porties afgevuld in plastic zakken met een filter voor gasuitwisseling.

6.1 Karakterisatie van de gebruikte champost.

Ten behoeve van deze teeltproef is champost opgehaald bij een teler. De gebruikte champost was niet gestoomd voorafgaand aan het gebruik als substraatcomponent. Het droge stof gehalte van de champost werd bepaald door mengmonsters te nemen en van elk mengmonster het droge stof gehalte te bepalen door droging bij 105°C. De gebruikte champost had een droge stof gehalte van 413 g/kg versgewicht (standaard deviatie 8.8 g/kg). Het totaal stikstof gehalte van de champost werd vastgesteld op 2.4% van de droge stof.

6.2 Substraatsamenstellingen

Een overzicht van de geteste substraatsamenstellingen wordt gegeven in Tabel 10. Het substraat voor *Pleurotus eryngii* heeft bij voorkeur een vochtgehalte van ongeveer 60% en een totaal stikstofgehalte van 1.2%. Echter, het stikstof dat aanwezig is in champost is voor een groot deel ingevangen in humusbestanddelen in de compost en daardoor niet biologisch beschikbaar. Bij behandelingen 1 t/m 4 is de champost daarom in de receptuur verwerkt zonder acht te slaan op het resulterende totaal stikstofgehalte. De hoeveelheid supplement in het substraat is daarbij telkens gelijk gehouden. Bij behandelingen 5 en 6 daarentegen is het totaal stikstofgehalte op 1.2% stikstof gehouden. Ter vergelijking is een behandeling toegevoegd waarin alle zaagsel is vervangen door champost

Tabel 10. Globale samenstelling van de geteste substraten.

Beh.	Substraat met	Vocht gehalte	Totaal stikstof (% vd droge stof)	Zaagsel (kg)	Champost (kg)	Supplement (kg)
1	0% champost	60%	1.21	11.209	0	3.755
2	9% champost	61%	1.32	10.200	1.009	3.755
3	18% champost	61%	1.44	9.191	2.018	3.755
4	27% champost	62%	1.57	8.182	3.026	3.755
5	18% champost	60%	1.20	9.191	2.018	4.080
6	27% champost	60%	1.20	8.182	3.026	4.293
7	100% champost	60%	2.30	0	12.890	5.604

De verschillende substraten werden afgevuld in 3 kg porties in plastic zakken met een filter voor gasuitwisseling. Per behandeling (substraat type) werden 8 zakken afgevuld. Vervolgens werden de substraten gepasteuriseerd door ze te stomen. Na iets meer dan 4 uur stomen was de temperatuur van het substraat in de zakken gestegen tot boven 95°C. Vervolgens liep de temperatuur in 4 uur tijd geleidelijk op tot 99.9°C. De stoom toevoer werd vervolgens gestopt. Na ruim 40 uur waren de substraten weer afgekoeld tot 22°C.

6.3 Teeltverloop

Nadat de substraten voldoende waren afgekoeld, werden de zakken op donderdag 1 oktober 2015 in een laminar flow kast geënt met 30 gram broed per zak. Vervolgens werden de zakken in een geklimatiseerde ruimte geplaatst bij een luchttemperatuur van 23°C (RV en CO₂ niet geregeld). De myceliumgroei vond plaats in het donker. Figuur 8 toont de doorgroeiing van de diverse substraten op dag 14 van de mycelium doorgroeifase. Er is een duidelijk



Figuur 8. Mate van doorgroeiing van de substraten in Tabel 10 na twee weken incubatie bij 23°C.

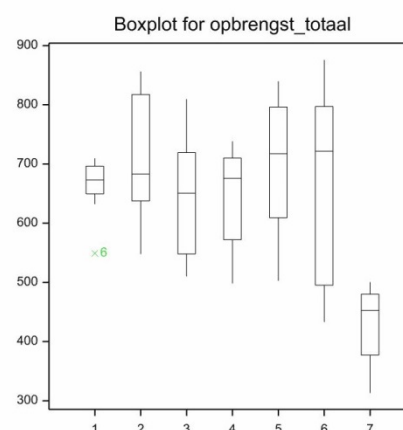
verschil te zien tussen het substraat waar geen champost aan werd toegevoegd en de overige substraten met meer of minder toegevoegde champost. Deze vertraging in de kolonisatie van het substraat indien champost werd toegevoegd was enigszins verrassend. In eerdere proeven zoals beschreven in paragraaf 2.3.1. was geen indicatie gevonden voor een remming van de myceliumgroei door champost. Het belangrijkste verschil tussen de champost die gebruikt werd voor de proeven in paragraaf 2.3.1. en de champost die gebruikt werd voor de hier beschreven teeltproef, was dat de champost voor de proeven in paragraaf 2.3.1. voorafgaand aan gebruik gedroogd was bij

Tabel 11. Overzicht van de belangrijkste karakteristieken voor teelt van *Pleurotus eryngii* met champost als substraat component.

Behandeling	Aantal dagen nodig voor substraat kolonisatie	Aantal dagen tot eerste oogstdag	Aantal dagen tussen afventileren en eerste oogstdag	Gemiddelde opbrengst (gram/zak)
1 0% champost 1.21% N	34.0 (s.d. 0)	48.0 (s.d. 1.2)	14.0 (s.d. 1.2)	662 (s.d. 52)
2 9% champost 1.32% N	46.3 (s.d. 4.7)	61.6 (s.d. 3.6)	15.4 (s.d. 1.5)	710 (s.d. 110)
3 18% champost 1.44% N	48.0 (s.d. 6.3)	63.0 (s.d. 6.3)	15.0 (s.d. 0)	643 (s.d. 109)
4 27% champost 1.57% N	50.0 (s.d. 3.7)	63.4 (s.d. 5.5)	13.4 (s.d. 6.0)	639 (s.d. 88)
5 18% champost 1.2% N	42.6 (s.d. 3.6)	57.5 (s.d. 3.6)	14.9 (s.d. 1.0)	699 (s.d. 116)
6 27% champost 1.2% N	43.5 (s.d. 5.3)	58.0 (s.d. 6.3)	14.5 (s.d. 2.4)	667 (s.d. 170)
7 100% champost 2.3% N	44.4 (s.d. 3.6.)	60.8 (s.d. 3.1.)	16.4 (s.d. 0.5)	429 (s.d. 66)

70°C en droog bewaard werd tot gebruik. De champost die gebruikt werd voor de teeltproef is niet vooraf gedroogd. Indien champost in de praktijk ooit gebruikt zou worden als substraat voor de teelt van andere paddenstoelen, zou ze immers ook niet gedroogd worden.

De belangrijkste karakteristieken van de teelt van *Pleurotus eryngii* met champost als substraat component staan weergegeven in Tabel 11 (de ruwe data zijn terug te vinden in Annex 1). Substraat van behandeling 1 (geen champost toegevoegd) was na 34 dagen voldoende doorgroeid om te kunnen worden afgeventileerd. De overige substraten hadden daar aanzienlijk langer voor nodig, variërend van gemiddeld 43 tot gemiddeld 50 dagen. Bij behandeling 1 waren alle 8 herhalingen op dezelfde dag voldoende doorgroeid om afgeventileerd te worden. Bij de behandelingen met een gedeelte champost in het substraat waren tussen de 8 herhalingen binnen de behandeling aanzienlijke verschillen te zien. Er was relatief weinig uitval door infectie; alleen bij behandelingen 3 en 4 ging elk 1 op de 8 zakken substraat verloren als gevolg van infectie. De verschillen in de tijdsduur die nodig was voor het koloniseren van het substraat bepalen voor het overgrote deel de tijdsduur die nodig tot de eerste oogstdag. Substraten die werden afgeventileerd produceerden na 13 tot 16 dagen oogstrijpe koningsoesterzwammen, ongeacht de substraatsamenstelling.



Figuur 9. Boxplot voor de opbrengst in de verschillende substraten.

Vervanging van een gedeelte van het zaagsel in het substraat door champost had geen effect op de gemiddelde opbrengst aan paddenstoelen. Echter, zoals de boxplot in Figuur 9 laat zien, introduceerde de vervanging van zaagsel door champost wel veel meer variabiliteit in de opbrengsten. Vervanging van alle zaagsel door champost resulteerde in een statistisch significante verlaging van de opbrengst (ANOVA, $p=0.05$).

De geproduceerde paddenstoelen leken niet veel van elkaar te verschillen voor wat betreft kwaliteit. Figuur 9 toont willekeurig gekozen foto's van de paddenstoelen van de verschillende behandelingen. Op veel van de koningsoesterzwammen waren donkere vlekken te zien. Die duiden mogelijk op een aantasting met bacteriën. Of dit ook werkelijk zo was, is niet onderzocht.



Figuur 10. Voorbeelden van de geproduceerd paddesntoelen van behandelingen 1 tot en met 4.

6.4 Conclusie

Het teellexperiment toont aan dat het mogelijk is om een gedeelte van het zaagsel in het substraat voor koningsoesterzwam *Pleurotus eryngii* te vervangen door champost, zonder dat dat ten koste gaat van opbrengst of paddenstoelkwaliteit. Echter, het volledig vervangen van het zaagsel in het substraat door champost leidt tot een reductie van de opbrengst met 85%.



Figuur 10 (vervolg). Voorbeeld van de geproduceerde paddenstoelen van behandelingen 5, 6 en 7.

Terwijl het gedeeltelijk vervangen van zaagsel in het substraat door champost geen effect heeft op de opbrengst aan paddenstoelen, heeft het een aanzienlijk effect op de tijd die nodig is om het substraat te laten koloniseren door de schimmel. Als een gedeelte van het zaagsel in het substraat werd vervangen door champost duurde het bijna anderhalf maal zo lang voordat het substraat voldoende doorgroeid was om te kunnen afventileren. Dit remmend effect was op basis van de lineaire groeisnelheid op gesteriliseerde champost (Tabel 6) niet voorzien. De resultaten die gepresenteerd zijn in Tabel 6 zijn behaald op een champost-substraat dat is gemaakt door champost eerst te drogen, vervolgens te bevochtigen en daarna te steriliseren bij 121°C. Dat is een werkwijze die weliswaar de voedingswaarde van de champost voor de schimmels netjes in kaart brengt, maar die tevens ver van de praktijk staat. Om die reden werd de champost die werd toegevoegd aan het substraat voor koningsoesterzwam niet voorbewerkt. Blijkbaar zorgt het drogen en steriliseren van champost voor een verwijdering van de remmende factoren die we waarnemen indien we champost onbewerkt aan het substraat voor koningsoesterzwam toevoegen.

7. Geciteerde literatuur

- Ayala, M., González-Muñoz S.S., Pinos-Rodríguez J.M., Vázquez C., Meneses M., Loera O., Mendoza G.D. (2011), Fibrolytic potential of spent compost of the mushroom *Agaricus bisporus* to degrade forages for ruminants. *African Journal of Microbiology Research*, 2011. **5**(3): p. 241-249.
- Chen, Y., Chefetz, B., Rosario, R., van Heemst, J. D. H., Romaine, C. P. and Hatcher, P. G (2000) Chemical Nature and Composition of Compost during Mushroom Growth. *Compost Science and Utilization*, 2000. **8**(4): p. 347-359.
- Cone, J.W., van Gelder, A.H., Visscher, G.J.W., Oudshoorn, L., (1996) Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61, 113-128.
- Gonani, Z., H. Riahi, and K. Sharifi (2011) Impact of using leached spent mushroom compost as a partial growing media for horticultural plants. *Journal of Plant Nutrition*, **34**(3): p. 337-344.
- Gerrits, J.P.G., (1994) Composition, use and legislation of spent mushroom substrate in the Netherlands. *Compost Science & Utilization*, **2**(3): p. 24-30.
- Gerrits, J.P.G. (1997) Ringonderzoek Champost 1996. *De Champignoncultuur* **41**(3): p. 99-101.
- Gerrits, J.P.G., H.C. Bels-Koning, and F.M. Muller (1967) Changes in compost constituents during composting, pasteurisation and cropping. *Mushroom Science* **6**: pp. 225-243.
- Gerrits, J.P.G. (1969) Organic compost constituents and water utilized by the cultivated mushroom during spawn run and cropping. *Mushroom Science* **7**: pp. 111-126.
- Iiyama, K., B.A. Stone, and B.J. Macauley (1994) Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(5): p. 1538-1546.
- Jurak E. (2015) How mushrooms feed on compost: conversion of carbohydrates and lignin in industrial wheat straw based compost enabling the growth of *Agaricus bisporus* PhD thesis WageningenUR. Chapter 4; Accumulation of recalcitrant xylan in mushroom compost is due to a lack of xylan substituent removing enzyme activities of *Agaricus bisporus* Page 55.
- Kim, Y.I., et al., Yield, nutrient characteristics, ruminal solubility and degradability of spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrates for ruminants *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012 **24**(11): p. 1560-1568.
- Patyshakuliyeva A. (2015) Unraveling the mystery of commercial cultivation of *Agaricus bisporus*; plant biomass utilization and its effect on mushroom production. PhD Thesis, WageningenUR.
- Sonnenberg A.S.M. & Blok C. (2012) Input-output Fase II (PT projectnummer 13887). Rapport nummer 2012-7.
- Straatsma, G.(2006) Spent mushroom substrate, SMS; "livestock manure" according to the Nitrate Directive or compost?
- Szmidt, R.A.K. and C. Chong, Uniformity of spent mushroom substrate (SMS) and factors in applying recommendations for use *Compost Sci. Util.*, 1995. **3**(1): p. 64-71.
- Ten Have R., Wijngaard H., Arie, Sonnenburg N., Straatsma G. & Schaap P., (2003) Lignin Degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable holocellulose during cultivation on compost. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2242-2245
- Tuyen, V.D., Cone, J.W., Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., Hendriks, W.H. (2012) Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresource Technology* 111, pp. 338-342
- Van Soest, P.J., McQueen, R.W., 1973 The chemistry and estimation of fibre *Proc. Nutr. Soc.* 32, 123-130.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991 Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Zhu, Y., Roestel van, A.(2002) Oriënterende studie naar de mogelijkheden voor hergebruik van champost. Rapport 2002-20.

Bijlage I.

Meetgegevens teeltproef met champost als vervanger voor zaagsel .

Beh.	Aandeel champost in substraat	Herhaling	Avventileer datum	# dagen substraat kolonisatie	eerste oogstdag	# dagen tussen avventileren en eerste oogstdag	Opbrengst (gram/zak)
1	0%	1	3 11 2015	34	47	13	667
		2	3 11 2015	34	47	13	632
		3	3 11 2015	34	48	14	670
		4	3 11 2015	34	49	15	710
		5	3 11 2015	34	47	13	693
		6	3 11 2015	34	49	15	549
		7	3 11 2015	34	47	13	676
		8	3 11 2015	34	50	16	700
2	9%	1	16 11 2015	47	61	14	825
		2	9 11 2015	40	57	17	672
		3	16 11 2015	47	62	15	856
		4	16 11 2015	47	63	16	695
		5	16 11 2015	47	62	15	664
		6	9 11 2015	40	58	18	548
		7	16 11 2015	47	61	14	810
		8	24 11 2015	55	69	14	611
3	18%	1	16 11 2015	47	62	15	726
		2	9 11 2015	40	55	15	543
		3	9 11 2015	40	55	15	510
		5	24 11 2015	54	69	15	700
		6	24 11 2015	54	69	15	651
		7	24 11 2015	54	69	15	565
		8	16 11 2015	47	62	15	810
4	27%	1	16 11 2015	47	63	16	565
		2	16 11 2015	47	62	15	685
		3	24 11 2015	54	71	17	594
		5	16 11 2015	47	62	15	718
		6	24 11 2015	54	69	15	498
		7	16 11 2015	47	63	16	739
		8	24 11 2015	54	54	0	676

Beh.	Aandeel champost in substraat	Herhaling	Afventileer datum	# dagen substraat kolonisatie	eerste oogstdag	# dagen tussen afventileren en eerste oogstdag	Opbrengst (gram/zak)
5	18%	1	9 11 2015	40	55	15	611
		2	16 11 2015	47	61	14	792
		3	9 11 2015	40	54	14	732
		4	9 11 2015	40	54	14	703
		5	16 11 2015	47	62	15	840
		6	16 11 2015	47	62	15	801
		7	9 11 2015	40	55	15	608
		8	9 11 2015	40	57	17	503
6	27%	1	16 11 2015	47	62	15	876
		2	9 11 2015	40	57	17	527
		3	24 11 2015	54	69	15	702
		4	9 11 2015	40	55	15	433
		5	9 11 2015	40	55	15	839
		6	16 11 2015	47	63	16	755
		7	9 11 2015	40	54	14	742
		8	9 11 2015	40	49	9	464
7	100%	1	16 11 2015	47	63	16	439
		2	16 11 2015	47	63	16	483
		3	16 11 2015	47	63	16	501
		4	16 11 2015	47	63	16	478
		5	9 11 2015	40	57	17	372
		6	16 11 2015	47	63	16	467
		7	9 11 2015	40	57	17	382
		8	9 11 2015	40	57	17	314