



**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék**

**SOLID STATE FERMENTATION AS A TOOL FOR
PRODUCTION OF THREE INDUSTRIALLY
VALUABLE MICROBIAL ENZYMES: CHITINASE,
LIPASE / ESTERASE AND TRANSGLUTAMINASE**

Ph.D értekezés tézisei

Készítette:

Nagy Viviána

okleveles biomérnök

Témavezető:

Dr. Szakács György

tudományos főmunkatárs

2009

1. BEVEZETÉS, A KUTATÁS CÉLJA

Doktori disszertációm a szilárd fázisú fermentáció alkalmazhatóságának vizsgálata köré épül.

A szilárd fázisú fermentáció (SSF) alatt mikrobák tenyésztését értjük vízoldhatatlan vagy vízben korlátozottan oldódó anyagokon. A SSF-t évezredek óta alkalmazzák elsősorban a Távol-Keleten különböző élelmiszerek előállítására (pl. szójaszós, rizsbor/sake, temphe), de Európában ill. az Egyesült Államokban a penicillin felfedezését követően döntően a süllyesztett (szubmerz) technológia (SF) terjedt el.

Az SSF számos előnnyel rendelkezik a klasszikus SF-fel szemben, és ezen fontos előnyök miatt válik egyre fontosabbá ipari alkalmazásokban. Ezek pl. nagyobb termelékenység, alacsonyabb beruházási és működtetési költség ill. kevesebb szennyvíz keletkezése. Az SSF olcsó tápanyagokat használ szubsztrátként, a fermentáció feldolgozása többnyire egyszerűbb és olcsóbb eljárásokkal lehetséges. További óriási előnye lehet az SF-fel szemben, hogy a nyers fermentált termék sok esetben mindenféle feldolgozás nélkül alkalmazható.

Az SSF-t az iparban jelenleg Japánban, Indiában, Kínában, kisebb mértékben az Egyesült Államokban és Franciaországban alkalmazzák, ipari enzimek, szerves savak ill. különböző anyagcseretermékek (antibiotikumok, mikotoxinok, biokontrol szerek) előállítására.

A doktori munkám legfőbb célkitűzése ezért az volt, hogy megvizsgáljam, milyen hatékonysággal termeltethetők bizonyos ipari enzimek SSF-ben. Három enzimmel dolgoztam, ezek a kitináz, lipáz ill. észteráz, valamint a transzglutamináz voltak, amely enzimek kiválasztását tényleges ipari projektek igényei diktálták.

Egy másik módszertan alkalmazása is hangsúlyos szerepet kapott a doktori munkámban: a szűrővizsgálat (angol szóval, a screening). A

szűrővizsgálat (mikroba törzsek vagy mutánsok közötti válogatás) igen munkaigényes és eléggé unalmas tevékenységnek tűnik, kevés kutató szereti. Viszont igen lényeges egy jól termelő mikroba kiválasztása a későbbi munkákhoz.

2. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

2.1. Ötven *Trichoderma harzianum* izolátum 3 ill. 5 napos szilárd fázisú fermentációban mért extracelluláris kitináz enzim termelésének, valamint a törzsek ITS1/ITS2 és *tefl* szekvenciájának ismeretében megállapítottuk, hogy nagy extracelluláris kitináz termelést a „szigorúan *harzianum* típusú” (*Trichoderma harzianum* „*sensu stricto*”) törzsek mutatnak. A másik csoportba sorolt egyéb törzseknel (*Trichoderma harzianum* „*sensu lato*”) jóval kisebb kitináz termelést tapasztaltunk (II. Nagy *et al.*, 2007).

A kitináz témakörben a doktori munkám egyik célja az volt, hogy vizsgáljam, vajon a *Trichoderma* nemzetségben belül a *Trichoderma harzianum* fajok esetében meg lehet-e előre jósolni bizonyos génszakaszok analízise alapján, hogy egy izolátum jó extracelluláris kitináz termelő-e.

Ehhez 50 különböző helyről származó izolátum 3 és 5 napos SSF-ben termelt extracelluláris kitináz termelését határoztuk meg búzakorpa – kitinpor keveréken. A mikrobákat többnyire talajmintából izoláltuk, ezek a világ különböző helyeiről származtak.

A bécsi Műegyetemen ugyanennek az 50 izolátumnak analizálták az ITS1, ITS2 ill. *tefl* szekvenciáját. Az ITS szekvenciák nem funkcionális genom szakaszok, amelyeket taxonómiai ill. molekuláris filogenetikai meghatározásoknál használnak, mert egyrészt könnyen amplifikálhatóak, másrészt igen nagy változatosságot mutatnak közeli fajok esetén is, valamint igen jól használhatóak faji szinten is, alfajok megkülönböztetésében. A *tefl* egy eukarióta transzlációs elongációs faktor, amelyet szintén alkalmaznak közeli fajok elkülönítésére.

A szekvencia analízis eredményeként a vizsgált törzseket két fő csoportra osztottuk. A „szigorúan *harzianum* típusba” azok a törzsek tartoztak (21 izolátum), amelyek ITS1/ITS2 és *tefl* szekvenciája megegyezett a referencia (típus) törzsként használt CBS 226.95 törzssel. A másik csoportba (29 izolátum) azok a törzsek kerültek, amelyek ITS1/ITS2 és *tefl* szekvenciája néhány bázispárban eltért a referencia izolátumétól.

3 napos korban a „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek átlag kitináz termelése, 2,3 IU/g sz.a. volt, míg az egyéb törzsek 3 napos átlag termelése 1,2 IU/g sz.a.-nak adódott. 5 napos SSF esetén ugyanezek az átlagértékek 4,1-nek ill. 1,7 IU/g sz.a.-nak adódtak, ami alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a „szigorúan *harzianum* típusú” izolátumok igen jó extracelluláris kitináz termelők.

2.2. A „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek nagy extracelluláris kitináz enzimtermelése nem az izolátumok gyorsabb növekedésének vagy több (változatosabb) kitináz izoenzim termelésének volt köszönhető. A „szigorúan *harzianum* típusú” törzseket nem jellemezte nagyobb extracelluláris celluláz enzimtermelés (II. Nagy *et al.* 2007)

Kísérleteink során próbáltuk kideríteni, mi állhat a jó kitináz termelő képesség mögött, ezért vizsgáltuk mindkét típusba tartozó törzsek növekedési sebességét kitin monomereken, mint a glükózamin ill. az N-acetil-glükózamin, referenciaként pedig glükózt használtunk. Érdekes módon nem tapasztaltunk különbséget a „szigorúan *harzianum*” ill. az egyéb típushoz tartozó izolátumok növekedési sebességei között.

Vizsgáltuk, hogy vajon a megnövekedett kitináz termelés háttérben az áll-e, hogy a „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek több kitináz izoenzimet termelnek, ezért natív ill. SDS PAGE alkalmazásával teszteltük mindkét típus néhány izolátumát N-acetil glükózaminidáz ill. endokitináz enzimekre. Az eredmények alapján azonban azt állapítottuk meg, hogy a „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek nem termelnek több kitináz izoenzimet, a kapott enzim csíkok intenzitásai nem korreláltak az SSF-ben mért enzimaktivitás adatokkal.

Felmerült az is, hogy esetleg a „szigorúan *harzianum* típusú” izolátumok jó extracelluláris kitináz termelése a megnövekedett fehérje kiválasztási képességüknek köszönhető, ezért vizsgáltuk néhány izolátum extracelluláris celluláz termelését is. Az eredmények alapján azonban a „szigorúan *harzianum* típusú” izolátumokat a kitináz enzimmel ellentétben nem jellemezte megnövekedett celluláz termelés.

2.3. Mivel a „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek az N-acetil mannóزامint nem tudták hasznosítani, kifejlesztettünk egy szelektív táptalajt a nagy extracelluláris kitináz termelő törzsek gyors azonosítására (II. Nagy *et al*, 2007)

Az egyedüli különbség, amit a két különböző típus között felfedezni tudtunk az volt, hogy a Biolog analízis szerint a „szigorúan *harzianum* típusú” törzsek nem voltak képesek az N-acetil mannóزامint szénforrásként hasznosítani. A Biolog teszt 95 különböző szénforrás asszimilációjának a vizsgálatát teszi lehetővé egy kísérletben.



1. ábra: Petri-csészés gyorsteszt a nagy kitináz enzimtermelő képességgel rendelkező törzsek szűrésére. Az ábrán 3 véletlenszerűen kiválasztott „szigorúan *harzianum* típusú” (A) és 6 egyéb (B) *T. harzianum* izolátum látható. A Petri-csészék bal oldali táptalaja glükózt, míg jobb oldali része N-acetil mannóزامint tartalmaz szénforrásként. A vörösre színeződött táptalaj utal a mikrobiális metabolikus aktivitásra.

2.4. Tizennégy *Penicillium* izolátum szilárd fázisú fermentációs szűrővizsgálatának eredményei alapján megállapítottuk, hogy néhány *Penicillium* törzs a *Trichoderma harzianum* „sensu lato” izolátumokkal azonos nagyságrendű extracelluláris kitináz termelést mutat (V. Binod *et al.* 2005).

A *Trichoderma harzianum* izolátumokon kívül vizsgáltuk *Penicillium* fajok extracelluláris kitináz enzimtermelését is. Az irodalomban igen kevés adatot találtunk ezen gombák kitináz termelésére. Tizennégy törzs szűrővizsgálatát végeztük el szintén búzakorpa – kitinpor tartalmú táptalajon, SSF alkalmazásával. A tesztelt törzsek közül a legmagasabb enzimaktivitást egy *P. aculeatum* törzs adta, a maximális aktivitása 3 napos SSF-ben 1,7 IU/g sz.a. volt. Azaz a *Penicillium* fajok valamivel gyengébb kitináz termelők, mint a jól termelő *T. harzianum* „szigorúan *harzianum* típusú” izolátumok.

A *P. aculeatum* törzs kitináz enzimét jellemeztük, hőmérséklet optimuma 50°C-nak, pH optimuma 4,0-es értéknek bizonyult, az enzim nem volt hőstabil. A *P. aculeatum* törzs által termelt kitináz izoenzimek molekulaméretei 82,7; 44,6; 28,2 és 26,9 kDa-nak adódtak gélkromatográfiás módszerrel, valamint 82,6; 33,9 és 29,1 kDa-nak SDS PAGE alkalmazásával. Ezt az izolátumot korábbi publikációkban ill. szabadalomban jó dextranáz enzimtermelőnek írták le.

2.5. Szilárd fázisú fermentációval és a készítmények kíméletes szárításával olyan olcsó lipáz és észteráz biokatalizátorokat (természetes módon immobilizált enzimeket) állítottunk elő, amelyek szerves kémiai biotranszformációs ill. biokonverziós folyamatokban nagy szelektivitással ill. jó konverzióval voltak alkalmazhatók (III. Tőke *et al.* 2007 és IV. Nagy *et al.* 2006).

A doktori munkám során a Szerves Kémia Tanszékkal szoros együttműködésben teszteltünk fonalagomba eredetű lipáz enzimeket

enantiomer szelektív biotranszformációra ill. sikeresen állítottunk elő szterin-észteráz enzimeket, szilárd fázisú fermentációval.

A cél az volt, hogy találjunk olyan tisztítatlan lipázt, amely nagy enantiomer szelektivitással képes katalizálni különböző szerves kémiai reakciókat ill. olyan fonalagomba eredetű szterin-észterázt, ami jó konverzióval képes észtert képezni. Ezért negyvenkét eddig nem, vagy csak kevésbé vizsgált mezofil fonalagombának a lipáz ill. szterin-észteráz termelését vizsgáltuk SSF-ben búzakorpán, búzakorpa – oliva olaj, valamint búzakorpa - növényi szterin-észter keveréken. Minden egyes fermentáció során a keletkezett fermentált anyagot kíméletesen megszáritottuk szobahőfokon, direkt módon, vagy acetonnal vízmentesítettük. A Szerves Kémia Tanszéken ezeket a nyers, tisztítatlan, száraz mintákat használtuk lipáz enzim esetében három különböző racém alkohol (1-feniletanol, 1-ciklohexiletanol ill. naftiletanol) acetilezéséhez. Szterin-észteráz enzim esetében a Szerves Kémia Tanszéken alkalmazott tesztreakció β -szitoszterin és laurinsav észterképzése volt.

A tisztítatlan SSF minták a szerves kémiai átalakításokban jó biokatalizátoroknak bizonyultak.

Az SSF-ben előállított nyers enzimek előnye, hogy jóval olcsóbbak, mint a kereskedelmi forgalomban fellelhető hasonló enzimek tisztított változatai. Számos alkalmazási területen az olcsóság sokkal fontosabb tényező, mint a biokatalizátor tisztasági foka, amennyiben ez a konverziót alapvetően nem befolyásolja.

2.6. *Gliocladium* és *Chaetomium* törzsek szobahőmérsékleten száritott szilárd fázisú fermentációs mintáival nagy enantiomer szelektivitással acetileztünk racém alkoholokat szerves oldószerekben (IV. Nagy *et al.* 2006).

Az eredmények alapján a tesztelt mikrobák közül nagy enantiomer szelektivitással katalizálták a racém 1-feniletanol acetilezését a *Chaetomium*, *Gliocladium* és *Scopulariopsis* törzsek enzimei. Racém 1-ciklohexiletanol esetében az előző nemzetségeken kívül a *Fusarium* és *Trichoderma* gombák adtak jó eredményt, míg racém naftiletanol esetén a *Chaetomium*, *Gliocladium*, *Thamnidium* és *Trichoderma* fonalagombák lipázai bizonyultak jó katalizátoroknak.

Preparatív léptékű biotranszformációban, 200 mg szubsztráttal végezve a tesztreakciókat a *Chaetomium globosum* és a *Gliocladium catenulatum* lipáz tartalmú szárított, tisztítatlan mintái jó enantiomer szelektivitással működtek.

2.7. *Aspergillus oryzae* és *A. sojae* törzsek szobahőmérsékleten szárított szilárd fázisú fermentációs tisztítatlan mintáival (*in situ* enzim, nyers enzim) jó konverzióval állítottunk elő szterin-észtereket (III. Tőke *et al.*, 2007).

Jó szterin-észter konverziót a tesztelt fonalgombák közül az *Aspergillus* törzsekkel értünk el, ezért a szűrővizsgálatba további *Aspergillus* törzseket is bevontunk. A legjobb eredményeket *A. oryzae* és *A. sojae* törzsekkel értünk el. Mindkettő törzsnek nagy előnye az, hogy biztonságos mikrobának számítanak (ún. GRAS mikrobák), az élelmiszeriparban már régóta alkalmazzák szójaszószt és gomba amiláz előállítására.

A két legjobb *Aspergillus* törzssel preparatív léptékű észterképzést is sikerült megvalósítani: Az SSF-ben termelt és kíméletesen szárított, tisztítatlan szterin-észteráz enzimmel 45-60%-os konverziókat értünk el.

2.8. *Streptomyces mobaraensis* NRRL B-3729, *S. paucisporogenes* ATCC 12596 és *S. platensis* NRRL 2364 törzsekkel sikeresen termeltettünk extracelluláris transzglutaminázt szilárd fázisú fermentációban és jellemeztük a képződött enzimeket. (I. Nagy és Szakács, 2008).

A transzglutamináz (TGáz) enzim az acil-transzferázok közé tartozik, egy fehérje térszerkezet módosító enzim, keresztkötéseket képes létrehozni glutamin és lizin komponensek között. Elsősorban az élelmiszeriparban alkalmazzák, fehérjedús élelmiszerek szerkezetének javítására, új típusú élelmiszerek előállítására és joghurt ill. egyéb tejtermékek, tészta minőségi javítására. Az iparban TGáz enzimet jelenleg *Streptomyces mobaraensis* sugárgombával termeltetnek sülylesztett fermentációban.

Mivel a TGáz enzimet az iparban kizárólag SF-fel állítják elő, és SSF-ben termelt aktinomicéta eredetű TGázra nem állt rendelkezésre adat, ezért a célunk az volt, hogy SSF-ben találjunk jó TGáz termelő sugárgombát.

Ehhez a szűrővizsgálathoz az alábbi mikrobákat használtuk: *S. mobaraensis* (Ajinomoto japán cég szabadalmi törzse), *S. platensis* (Novozymes Inc. szabadalmi törzse), illetve *S. paucisporogenes* törzset, valamint 17 nem identifikált aktinomicétát, amiknek a többsége dél-afrikai talajmintákból lett korábban a laborunkban izolálva.

A szűrővizsgálat során 26-féle különböző szubsztrátot teszteltünk SSF-ben, így gabonákat, gabonapelyheket, korpákat, különböző lencsákat, borsókat és babokat. Jó TGáz enzimtermelést azokon a szubsztrátokon értünk el, amelyek magas fehérjetartalommal rendelkeztek. A legjobbnak a májbab és a mungóbab bizonyult. Maximális enzimaktivitást a *S. mobaraensis* törzssel 3 napos SSF-ben kaptunk, az aktivitás 0,7 IU/g sz.a. volt, *S. platensis* esetében a 7 napos SSF érték volt a legmagasabb, ez 5,1 IU/g sz.a.-nak adódott, míg a *S. paucisporogenes* törzs 4 napos korban érte el a maximális 4,2 IU/g sz.a. aktivitást. Ez utóbbi törzs esetében még nem írtak le az irodalomban TGáz termelést.

A három sugárgomba által termelt TGáz enzimek hőmérséklet optimuma 45-50°C körül volt, pH optimumuk 7-8 tartományban volt. A molekulaméretük SDS PAGE alkalmazásával 37-38 kDa-nak adódott.

A nem identifikált sugárgombákat májbabon ill. mungóbabon teszteltük, legmagasabb aktivitást a TUB B-739-es izolátummal érték el, ez a sugárgomba 5 napos SSF-ben 5,9 IU/g sz.a. aktivitást mutatott. A TUB B-739-es izolátumot a Ch épület virágágyasából vett talajmintájából izoláltuk. Az izolátumot a német DSMZ gyűjteményben egy ritka *Streptomyces* fajként identifikálták.

3. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

3.1. Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

I. Nagy, V. and Szakacs, G. (2008) Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid state fermentation. *Letters Appl Microbiol* **47**. 122-127. IF: 1,593

II. Nagy, V.; Seidl, V.; Szakacs, G.; Komon-Zelazowska, M.; Kubicek, C.P. and Druzhinina, I. (2007) Application of DNA barcodes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Appl Environ Microbiol* **73**. 7048-7058. IF: 3,532

III. Tőke, E.R.; Nagy, V.; Recseg, K.; Szakács, G. and Poppe, L. (2007) Production and application of novel sterol esterases from *Aspergillus* strains by solid state fermentation. *JAOCS* **84**. 907-915. IF: 0,910

IV. Nagy, V.; Tőke, E.R.; Kheong, L.C.; Sztzker, G.; Ibrahim, D.; Che Omar, I.; Szakacs, G. and Poppe, L. (2006) Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. *J Mol Catal B: Enzymatic* **39**. 141-148. IF: 2,149

V. Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, V.; Sandhya, C.; Szakacs, G.; Pócsi, I. and Pandey, A. (2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microbiol Technol* **36**. 880-887. IF: 1,897

3.2. Egyéb publikációk:

Rahulan, R.; Nampoothiri, K.M.; Szakacs, G.; Nagy, V. and Ashok, P. (2009) Statistical optimization of L-leucine aminopeptidase production from *Streptomyces gedanensis* IFO 13427 under submerged fermentation using response surface methodology. *Biochem Eng J* **43**. 64-71. IF: 1,872

Nagy, V.; Nampoothiri, K.M.; Pandey, A.; Rahulan, R. and Szakacs, G. (2008) Production of L-leucine aminopeptidase by selected *Streptomyces* isolates. *J Appl Microbiol* **104**. 380-387. IF: 2,206

Nampoothiri, K.M.; Nagy, V.; Kovacs, K.; Szakacs, G. and Pandey, A. (2005) L-leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus* fungi. *Letters Appl Microbiol* **41**. 498-504. IF: 1,593

Szakacs, G.; Tengerdy, R.P. and Nagy, V. (2004) Cellulases. In Enzyme Technology, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol and C. Larroche, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, Chapter 13, 246-265. ISBN 81-87680-12-1

Nampoothiri, K.M.; Tomes, G.J.; Roopesh, K.; Szakacs, G.; Nagy, V.; Soccol, C.R. and Pandey, A. (2004) Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **118**. 205-214. IF: 1,102

Ramachandran, S.; Patel, A.K.; Nampoothiri, K.M.; Francis, F.; Nagy, V.; Szakacs, G. and Pandey, A. (2004) Coconut oil cake - a potential raw material for the production of alpha-amylase. *Bioresource Technol* **93**. 169-174. IF: 2,180

3.3. Poszterek és előadások:

Nagy, V.; Tőke, E.R.; Kheong, L.C.; Sztzker, G.; Ibrahim, D.; Omar, I.C.; Szakacs, G. and Poppe, L.: Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases of *Gliocladium* and *Chaetomium* origin produced by solid state fermentation. 9th International Workshop on Trichoderma and Gliocladium, Apr.6-8, 2006, Vienna, Austria (poszter)

Nagy, V.; Kubicek, C.P.; Seidl, V.; Druzhinina, I. and Szakács, G.: Increased extracellular chitinase production in solid substrate fermentation by the *Trichoderma harzianum* ex-type clade. 1st Central European Forum for Microbiology (CEFOM) and the annual meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Oct.26-28, 2005, Keszthely (előadás)

Nagy V.; Szakács, G. and Pandey, A.: *Trichoderma harzianum* izolátumok kitináz enzimtermelésének vizsgálata szilárd fázisú

fermentáció alkalmazásával. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Oct. 7-9, 2004, Keszthely (poszter)

Nagy, V. and Szakács, G.: *Trichoderma* fajok alkalmazása ipari fermentációs folyamatokhoz. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2004. évi Nagygyűlése és a X. Fermentációs Kollokvium, Oct. 7-9, 2004, Keszthely (előadás)

Nagy, V.; Szakacs, G. and Pandey, A.: Production of chitinases with *Trichoderma harzianum* isolates using solid substrate fermentation. 8th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*, Sept. 20-23, 2004, HangZhou, China (poszter)

-

Nagy, V. and Kovács, K.: Biotechnology at Budapest University of Technology and Economics, Hungary. International Seminar on Biotechnology, Febr. 10, 2004, Sree Ayyappa College For Women, Chunkankadaí, India (előadás)

Nagy, V.; Szakács, G. and Pandey, A.: Production of chitinolytic enzymes by selected *Penicillium* strains in solid substrate fermentation. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Oct. 9-11, 2003, Balatonfüred (poszter)

Nagy, V.; Szakács, G. and Pandey, A.: Production of chitinolytic enzymes by *Trichoderma harzianum* using solid substrate fermentation. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Oct. 9-11, 2003, Balatonfüred (poszter)

Nagy, V.; Linden, J.C.; Tengerdy, R.P. and Szakacs, G.: Coexistence of filamentous fungi in semi-solid and solid state fermentation. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Oct. 9-11, 2003, Balatonfüred (poszter)

Nagy, V.; Linden, J.C.; Tengerdy, R.P. and Szakacs, G.: Coexistence of filamentous fungi in semi-solid and solid state fermentation. 2003 SIM Annual Meeting, Aug. 10-14, 2003, Minneapolis, MN, USA (poszter)

Nagy, V.; Szakács, G. and Pandey, A.: *Trichoderma harzianum* isolates capable of producing chitinase in solid substrate

fermentation. International Conference on the Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry and Biology (ICB-2003), Apr. 28-30, 2003, Trivandrum, India (poszter)