

HIỆU QUẢ ETANOL NGĂN CHẶN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA NẤM MỐC

Efficiency of Ethanol Inhibition of Moulds Growth Rate

Đào Thiện¹, Trần Thanh Hoa², Trần Thị Lan Hương¹

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học-Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên lạc: dao.thien@hua.edu.vn

TÓM TẮT

Nhiều loại nấm mốc phát triển gây hại trên nông sản sau thu hoạch. Tổn thất do nấm mốc gây ra chiếm hơn 20% sản lượng hàng năm, vì vậy cần nghiên cứu các biện pháp nhằm hạn chế tổn thất sau thu hoạch bởi nấm mốc. Ethanol được coi là một hợp chất không độc hại GRAS (Generally Regarded as Safe) có thể được hình thành nhờ quá trình chuyển hóa sinh học. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bài báo này bước đầu đã chỉ ra được tiềm năng của ethanol trong việc ngăn chặn sự phát triển của 3 chủng nấm mốc *Aspersillus flavus* NN1, *Penicillium digitatum* TP1, *Penicillium italicum* TP2. Với nồng độ ethanol 7% khối lượng trong điều kiện $t = 30^{\circ}\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$ đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của 3 chủng nấm mốc nghiên cứu nói trên. Kết quả này mở ra khả năng ứng dụng ethanol trong bảo quản nông sản, thay thế các hợp chất hóa học độc hại với môi trường đang được sử dụng hiện nay.

Từ khóa: *Aspersillus flavus*, ethanol, nấm mốc, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, ức chế.

SUMMARY

The moulds are rapidly growth and they seriously damage agricultural production after harvest. The losses were estimated at an approximately 20% per year. Consequently, it is necessary to control the moulds contamination of the postharvest products. Ethanol is used as Non-biological control, in which involve chemicals that are Generally Regarded as Safe product (GRAS). This study showed that the conditions 30°C , $0,99 a_w$, 7% ethanol w/w completely inhibit the development of three strains *Aspersillus flavus* NN1, *Penicillium digitatum* TP1 and *Penicillium italicum* TP2. The results confirmed that the ethanol was reported to control postharvest decay of three strain moulds and the applicability of ethanol in the preservation of agricultural products could replace the toxic chemical compounds.

Key words: *Aspersillus flavus*, ethanol, inactivation, moulds, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam có khí hậu nhiệt đới, nóng ẩm nên rất thuận lợi cho nấm mốc phát triển. Nấm mốc có mặt khắp mọi nơi và thường phát sinh, phát triển trên các sản phẩm lương thực, thực phẩm, rau quả. Bên cạnh việc nấm mốc gây hư hỏng, thối rữa, làm giảm chất lượng và giá trị sử dụng nông sản, còn có rất nhiều loài nấm mốc tiết độc tố gây bệnh cho con người, trong đó nhiều loại độc

tố do nấm tiết ra ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người, thậm chí có thể gây tử vong như aflatoxin, ochratoxin A, patulin... (D'Mello và Macdonald, 1997).

Rất nhiều công trình nghiên cứu các biện pháp nhằm ngăn chặn sự phát triển của nấm mốc trên nông sản sau thu hoạch đã được công bố như bảo quản trái cây sau thu hoạch bằng hoá chất như sulfitsodium Na_2SO_3 (sinh ra khí SO_2 để trừ mốc), hoặc

làm chậm quá trình chín của trái cây bằng cách sử dụng một số hoá chất như nitrat bạc (AgNO_3), axit gibberellic (GA_3)... Tuy nhiên, các loại hóa chất nói trên đều là những hoá chất độc hại, nếu liều lượng sử dụng vượt quá mức cho phép có thể ảnh hưởng tới sức khoẻ người tiêu dùng. Đặc biệt các sản phẩm xử lý bằng hoá chất gặp phải rào cản rất nghiêm ngặt khi xuất khẩu sang các nước như EU, Mỹ, Nhật. Vì vậy, việc nghiên cứu theo hướng sản xuất nông sản sạch nên thực hiện bằng phương pháp phòng trừ sinh học trước và sau thu hoạch. Cần hạn chế sử dụng các hóa chất độc hại, nên thay bằng các chất không độc hại. Gần đây, một xu hướng đang được phát triển trên thế giới là sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên hay sinh học để bảo quản nông sản. Ethanol từ lâu đã được biết đến như một chất kháng khuẩn (Daifas và cs.; 2000, 2003), là sản phẩm được tạo thành từ quá trình chuyển hoá sinh học từ glucoza nhờ vi sinh vật. Ethanol được thế giới công nhận là một hợp chất không độc hại GRAS (Generally Regarded as Safe) (USDA National Organic Program, 2001) và đã được sử dụng trong nhiều lĩnh vực (Romanazzi và cs., 2007; Karabulut và cs., 2004).

Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng sử dụng ethanol như hợp chất kháng nấm, nhưng vấn đề này tại Việt Nam hiện nay vẫn chưa được quan tâm. Vì vậy, nghiên cứu này mong muốn bước đầu khẳng định khả năng ứng dụng ethanol nhằm ngăn chặn sự phát triển của nấm mốc.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng nấm mốc

Chủng nấm mốc sử dụng cho nghiên cứu là *Aspersillus flavus* NN1 được phân lập từ mẫu thóc nhiễm nấm mốc. *Penicillium digitatum* TP1, *P. italicum* TP2 được phân lập từ các mẫu quả cam hồng. Đặc điểm hình

thái các chủng nấm mốc phù hợp theo miêu tả của Samson và cs. (1995). Các chủng nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PDA (môi trường khoai tây, glucose và agar) và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy sử dụng để thu nhận bào tử là môi trường PDA và kiểm tra khả năng ức chế của ethanol là môi trường PDA có bổ sung ethanol với các nồng độ lần lượt là 1, 3, 5, 7% so với khối lượng. pH ban đầu cho các thí nghiệm là $5,7 \pm 0,1$. Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ 30°C, hoạt độ nước a_w là 0,99 và được lặp lại 3 lần.

2.3. Chuẩn bị dung dịch bào tử nấm mốc

Nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 30°C. Sau 7 ngày, tiến hành thu hồi bào tử nấm mốc với 5 ml dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 9 g/l nước cất) có bổ sung thêm Tween 80 (0,1% thể tích) bằng cách gạt nhẹ trên bề mặt của nấm mốc với sự trợ giúp của pipet Pasteur. Mẫu kiểm tra cho thấy, các bào tử thu hồi theo phương pháp trên đều đảm bảo 100% độ sống sót, phù hợp với các nghiên cứu trước đây (Dao và cs., 2008). Dung dịch bào tử nấm mốc được xác định nồng độ bằng buồng đếm Malassez và chuẩn hoá để đạt được nồng độ 2.10^5 đến 4.10^5 ml⁻¹.

2.4. Điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy PDA, bổ sung nồng độ ethanol từ 0 đến 7% (khối lượng). Ethanol được bổ sung khi nhiệt độ môi trường 45°C và môi trường sau khi bổ sung ethanol được chia đều vào các đĩa thạch, mỗi đĩa 20 ml. Sau khi môi trường đông tụ được đặt trong hộp kín với dung tích 2 lít trên một giá đỡ. Nồng độ ethanol được kiểm soát bằng dung dịch ethanol 100 ml cùng nồng độ với môi trường nuôi cấy ở đáy hộp. Môi trường được đặt trong hộp sau 48h ở 30°C nhằm cân bằng nồng độ giữa thể hơi và thể lỏng trước khi tiến hành nuôi cấy các chủng nấm mốc. Tất

cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với thời gian nuôi cấy khác nhau.

2.5. Đánh giá tốc độ tăng trưởng của đường kính khuẩn lạc

Sự phát triển của nấm mốc được xác định trực tiếp bằng đường kính phát triển của khuẩn lạc theo thời gian (Trinci, 1969; Gervais và cs., 1988).

Tốc độ tăng trưởng của nấm mốc (μ , mm ngày⁻¹), được xác định dựa trên độ dốc (hệ số a) của bán kính vòng khuẩn lạc so với thời gian theo phương trình hồi quy tuyến tính.

2.6. Xử lý số liệu

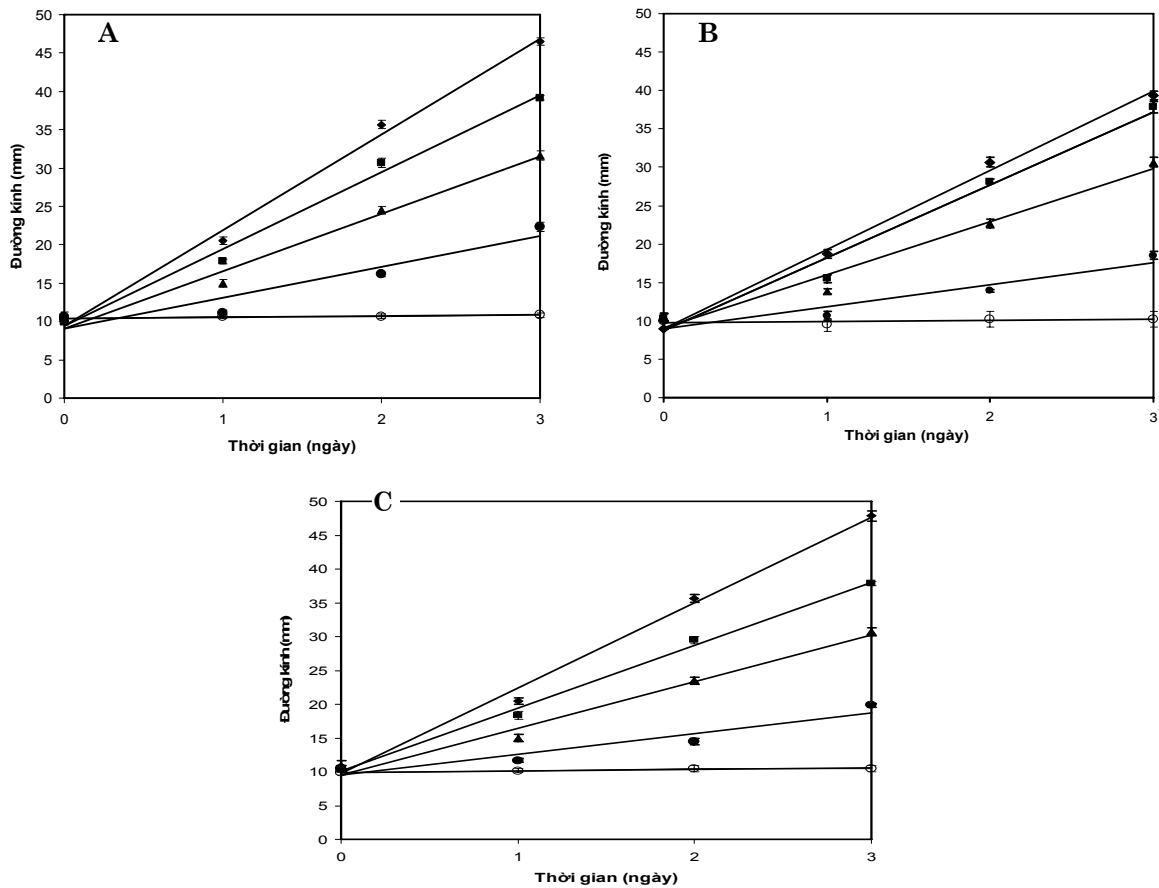
Các số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm Slide Write 5.0 và Microsoft Excel.

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol tới đường kính phát triển của khuẩn lạc của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2

Các chủng nấm mốc được nuôi cấy trong điều kiện phát triển tối ưu: nhiệt độ 30°C và a_w 0,99 với các nồng độ ethanol thay đổi lần lượt là 0; 1; 3; 5 và 7% (Hình 1).

Từ hình 1 có thể thấy được sự khác biệt một cách rõ rệt sự phát triển của các chủng nấm mốc thể hiện qua đường kính phát triển khuẩn lạc theo thời gian. Ở công thức đối chứng, đường kính khuẩn lạc lớn nhất. Đường kính của khuẩn lạc tăng lên hơn 4 lần sau 3 ngày nuôi cấy đối với cả 3 chủng nấm mốc.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU



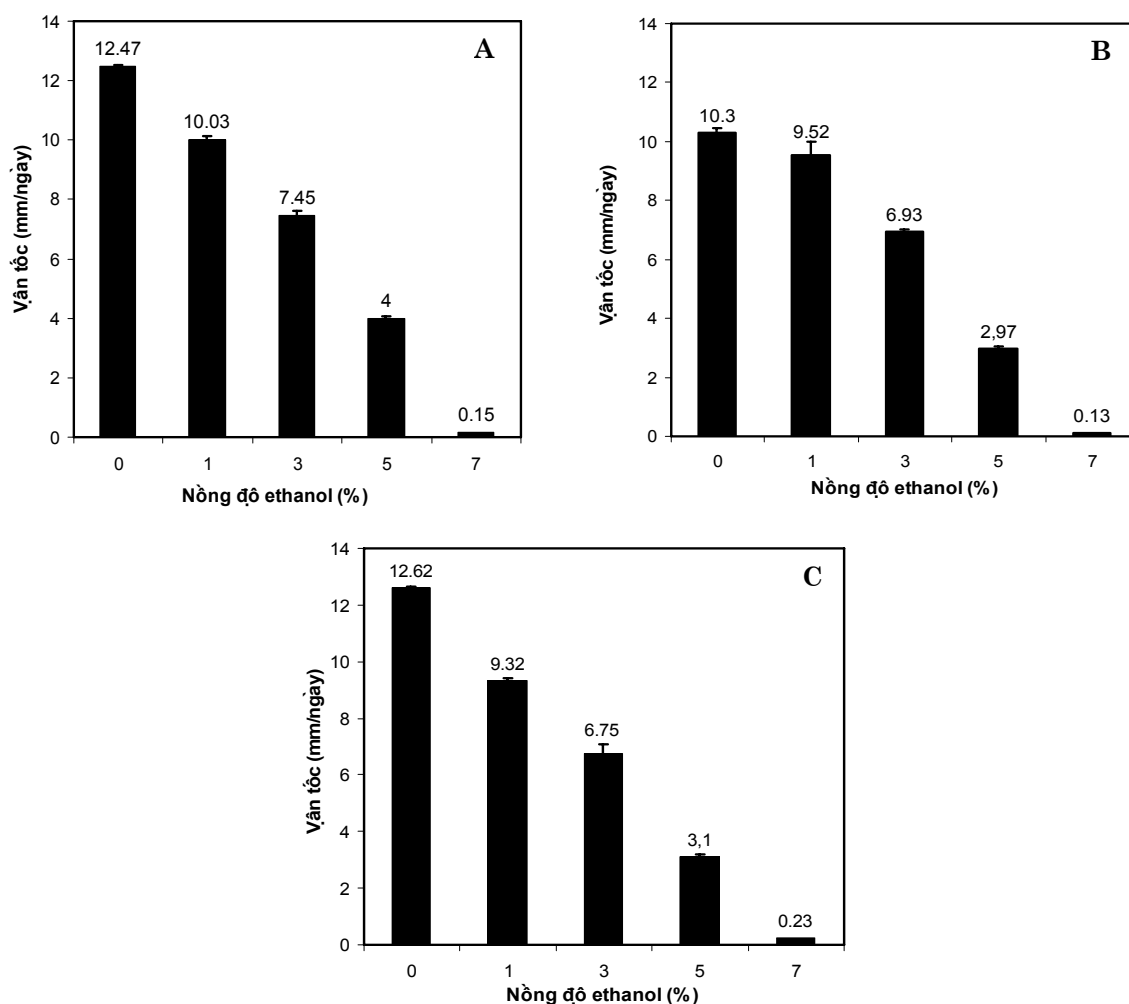
Hình 1. Sự phát triển của nấm *A. flavus* NN1 (A), *P. digitatum* TP1 (B), *P. italicum* TP2 (C) trên môi trường PDA có bổ sung ethanol với các nồng độ 0% (♦), 1% (■), 3% (▲), 5% (●), 7% (o) khối lượng ở điều kiện $t = 30^{\circ}\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$

Với nồng độ 1% ethanol tác dụng ức chế của chúng đến sự phát triển của 3 chủng nấm chưa được thể hiện rõ nét. Nhưng khi nồng độ ethanol tăng lên tới 3% thì tác dụng ức chế của chúng tới sự phát triển 3 chủng nấm mốc được thể hiện rõ rệt hơn, đường kính phát triển của khuẩn lạc đã giảm đáng kể so với công thức đối chứng. Khi nồng độ ethanol ở các công thức thí nghiệm tăng lên thì đường kính phát triển của khuẩn lạc nấm mốc cũng giảm dần theo thời gian thể hiện rất rõ. Ở nồng độ 5%, đường kính của khuẩn lạc chỉ tăng lên 2; 1,5; 1,5 lần sau 3 ngày nuôi cấy lần lượt với các chủng *A. flavus* NN1,

P. digitatum TP1, *P. italicum* TP2. Tác dụng ức chế sự phát triển của nấm mốc thể hiện rõ nhất ở nồng độ ethanol bằng 7%. Với nồng độ này, đường kính khuẩn lạc gần như không thay đổi sau 3 ngày nuôi cấy đối với cả 3 chủng nấm mốc.

3.2. Tốc độ phát triển của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2

Kết quả ức chế sự phát triển của nấm mốc bởi ethanol được thể hiện rõ rệt hơn qua hình tốc độ phát triển của các chủng nấm mốc (Hình 2).



Hình 2. Tốc độ phát triển của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1 (A), *P. digitatum* TP1 (B), *P. italicum* TP2 (C), trên môi trường PDA có bổ sung ethanol ở điều kiện $t = 30^{\circ}\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$

Hình 2 cho thấy, sự phát triển của nấm mốc giảm dần theo sự gia tăng của nồng độ ethanol và biểu hiện rất rõ rệt. Ở nồng độ ethanol 5% thì nấm mốc phát triển kém, tốc độ chỉ đạt 4; 2,97 và 3,1 (mm ngày⁻¹). Trong khi đó ở công thức đối chứng, tốc độ phát triển đạt 12,47; 10,3 và 12,62 (mm ngày⁻¹), lần lượt với *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2.

Điều này được thể hiện rõ hơn tại nồng độ ethanol 7%: tốc độ phát triển của 3 chủng là rất nhỏ 0,15; 0,13 và 0,23 (mm ngày⁻¹), nhỏ hơn so với công thức đối chứng (0% ethanol) lần lượt là 80, 70 và 60 lần đối với *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1 và *P. italicum* TP2. Từ các kết quả trên, có thể kết luận rằng, ở nồng độ 7% thì sự ức chế của ethanol đối với nấm mốc là tốt nhất. Cả 3 chủng nấm mốc đều bị ức chế sự phát triển hoàn toàn tại nồng độ 7%.

Các hệ số tương quan của phương trình hồi quy tuyến tính của 3 chủng nấm mốc và tại các nồng độ ethanol khác nhau đều lớn hơn 0,9. Điều này thể hiện mô hình hồi quy tuyến tính bậc 1 rất thích hợp cho sự miêu tả ảnh hưởng của nồng độ ethanol tới tốc độ phát triển của 3 chủng nấm mốc.

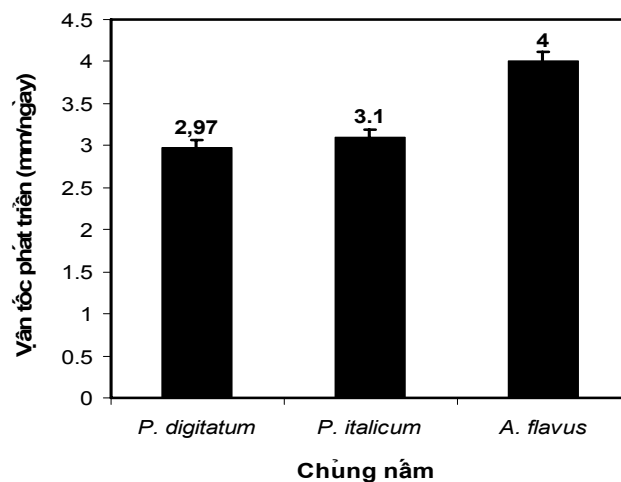
3.3. Tốc độ phát triển của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2 ở nồng độ ethanol 5%

Dựa vào các kết quả và số liệu thu được, nghiên cứu đã tiến hành so sánh tốc độ phát

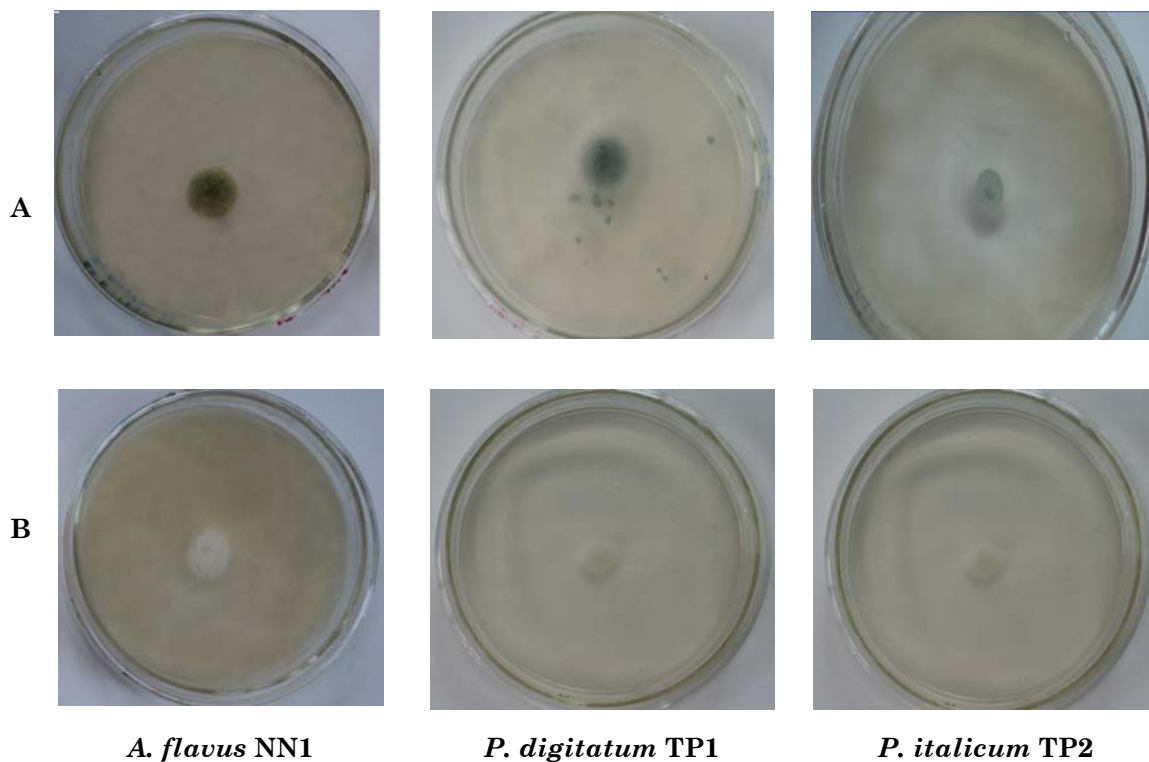
triển của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2 tại nồng độ ethanol 5% (Hình 3).

Qua hình 3 và hình 4 có thể nhận thấy chủng nấm *A. flavus* NN1 phát triển mạnh hơn 2 chủng nấm *Penicillium* ở điều kiện nhiệt độ 30°C ; hoạt độ nước a_w 0,99 và nồng độ xử lý ethanol là 5%. Sự phát triển của 2 chủng nấm *Penicillium* cũng có khác nhau, nhưng sự khác biệt này không rõ rệt, nấm *P. digitatum* phát triển kém hơn nấm *P. italicum*. Vậy có thể sắp xếp theo thứ tự độ nhạy cảm với ethanol lần lượt là *P. digitatum*, tiếp đến *P. italicum* và cuối cùng là *A. flavus*.

Tốc độ phát triển của 3 chủng nấm giảm dần từ chủng *A. flavus* NN1 là 4,0 (mm ngày⁻¹) đến *P. italicum* TP1 là 3,1 (mm ngày⁻¹) và thấp nhất là nấm *P. digitatum* TP2 chỉ đạt 2,9 (mm ngày⁻¹).



Hình 3. Tốc độ phát triển của 3 chủng nấm mốc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2 trên môi trường PDA có bổ sung 5% ethanol ở điều kiện $t = 30^{\circ}\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$



Hình 4. Khuẩn lạc *A. flavus* NN1, *P. digitatum* TP1, *P. italicum* TP2 trên môi trường PDA sau 48h giờ nuôi cấy ở điều kiện $t = 30^{\circ}\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$ nồng độ ethanol 0% (A), 5% (B)

Các hình ảnh (Hình 4) của 3 chủng nấm sau 2 ngày nuôi cấy đã cho thấy sự khác biệt về sự phát triển của các chủng nấm nghiên cứu dựa theo hình thái hệ sợi nấm và màu sắc khuẩn lạc. Sau 2 ngày, chủng nấm *Penicillium* mới bắt đầu hình thành hệ sợi nấm và màu của khuẩn lạc mới hơi có màu trắng của hệ sợi nấm, nhưng nấm *A. flavus* NN1 lại có biểu hiện các hệ sợi nấm của nấm đã hình thành rõ và khuẩn lạc có màu trắng chứng tỏ hệ sợi nấm bắt đầu phát triển mạnh.

4. THẢO LUẬN

Geiges và Kuchen (1981) đã chỉ ra rằng, nồng độ 5% ethanol (khối lượng) đủ ngăn chặn sự phát triển của nấm *T. harzianum* trên bánh mì, tại độ ẩm 46% và nhiệt độ 25°C. Ngoài ra, Geiges và Kuchen (1981) còn cho biết nấm *T. harzianum* nhạy cảm với ethanol nhiều hơn so với *P. expansum* hay *A. oryzae*. Ethanol có thể ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm mốc *P. citrinum* (4,4% khối lượng) và *P. glaucum* (4% khối lượng) (Krause và Ellis, 1973). Theo nghiên cứu này, để ức chế hoàn toàn sự phát triển của 3 chủng nấm nghiên cứu, nồng độ ethanol phải cao hơn (7% khối lượng). Có thể giải thích sự khác nhau giữa kết quả của nghiên cứu này và kết quả của các tác giả nước ngoài bởi các điều kiện thí nghiệm và các chủng giống nghiên cứu không hoàn toàn giống nhau (đặc biệt là về hoạt độ nước, môi trường nuôi cấy, nhiệt độ).

Sau 5 ngày xử lý bởi hơi ethanol với nồng độ 0,16% (thể tích) đã làm chậm sự thối hỏng trên quả cam bởi nấm mốc *P. digitatum* và *P. italicum* lần lượt là 10 ngày và 8 ngày (Yuen và cs., 1995). Kết quả của nghiên cứu này nhận được cũng tương tự như nhận xét trên: nấm *P. digitatum* TP1 nhạy cảm với ethanol hơn so với *P. italicum* TP2. Tại sao *P. digitatum* lại nhạy cảm hơn với ethanol? điều này có thể giải thích bằng lượng ethanol tác dụng lên màng tế bào. Lượng ethanol tác dụng lên màng tế bào

càng lớn nếu diện tích tiếp xúc giữa bề mặt tế bào và môi trường có chứa ethanol càng lớn. Nấm *P. digitatum* có bào tử dài 6 - 8 μm và có thể lên tới 15 μm , còn kích thước của bào tử nấm *P. italicum* và *A. flavus* nhỏ hơn, lần lượt là 3 - 5 μm và 4 - 5 μm (Pitt và Hocking, 1999) nên diện tích tiếp xúc của bào tử *P. digitatum* với ethanol lớn hơn. Nhưng cũng có những nghiên cứu chỉ ra rằng, tại nhiệt độ 25°C các bào tử của *P. implicatum* với kích thước bào tử 2,5 - 3 μm lại nhạy cảm với ethanol 10% (thể tích) hơn so với *P. expansum* có kích thước bào tử 3 - 3,5 μm hay *P. lanoso-coeruleum* (*P. commune* Thom) có kích thước bào tử là 3,5 - 4 μm (Geiges và Kuchen, 1981). Vì vậy, chưa thể kết luận được sự liên quan giữa kích thước bào tử và sự nhạy cảm với ethanol, nhưng có thể chắc chắn rằng nồng độ ethanol bên trong tế bào quyết định tới sự nhạy cảm của các chủng nấm mốc (Cullis và De Kruijff, 1979).

Ethanol được coi là hợp chất không độc hại GRAS (Generally Regarded as Safe) tại Hoa Kỳ (USDA National Organic Program, 2001). Kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra được khả năng ứng dụng của ethanol như một chất phòng trừ nấm tự nhiên và cần nghiên cứu sâu hơn nữa trong công nghệ thực phẩm, bảo quản rau quả sau thu hoạch vì đây là những loại thực phẩm có nguy cơ nhiễm nấm cao.

5. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu được trình bày trên đã thể hiện được hiệu quả của ethanol trong việc ngăn chặn sự phát triển của 3 chủng nấm mốc ở các điều kiện $t = 30^\circ\text{C}$, hoạt độ nước $a_w = 0,99$. Chủng nấm mốc *P. digitatum* TP1 mẫn cảm với ethanol nhất, sau đó là *P. italicum* TP2 và *A. flavus* NN1.

Khả năng ức chế sự phát triển của 3 chủng nấm mốc nói trên phụ thuộc vào nồng độ sử dụng ethanol. Tại nồng độ 7% ethanol, cả 3 chủng nấm mốc đều bị ức chế hoàn toàn.

Kết quả nghiên cứu này đã khẳng định khả năng ứng dụng ethanol để ức chế sự phát triển của nấm mốc trong việc bảo quản thực phẩm và nông sản sau thu hoạch.

Cần tiếp tục nghiên cứu sử dụng các điều kiện nhiệt độ và hoạt độ nước khác nhau nhằm xác định đồng thời nồng độ ethanol, nhiệt độ và hoạt độ nước thích hợp cho việc ức chế sự phát triển của nấm mốc và tiến tới đưa ra qui trình sử dụng trong quá trình bảo quản nông sản sau thu hoạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cullis, P.R. & De Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Biomembr.* 559(4), 399-420.
- Daifas, D.P., Smith, J.P., Blanchfield, B., Cadieux, B., Sanders, G. & Austin, J.W. (2003). Effect of Ethanol on the Growth of *Clostridium botulinum*. *J. Food Prot.* 66, 610 - 17.
- Daifas, D.P., Smith, J.P., Tarte, I., Blanchfield, B. & Austin, J.W. (2000). Effect of ethanol vapor on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in a high moisture bakery product. *J. Food Saf.* 20, 111–25.
- Dao, T., Bensoussan, M., Gervais, P. and Dantigny, P. (2008). Inactivation of conidia of *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum* and *P. italicum* by ethanol solutions and vapours. *International Journal of Food Microbiology* 122, 68-73.
- D'Mello, J.P.F. & Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69(1-3), 155-66.
- Geiges, O. and Kuchen, W., (1981). Konservieren von Brot mit thylakohol. 2. Mitt.: Grundlagen zur BrotKonservierung mit thylakohol. *Getreide, Mehl und Brot* 35, 263-268.
- Gervais, P., Bensoussan, M., Grajek, W., (1988). Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicillium roquefortii* on solid substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 389-392
- Karabulut, O.A., Gabler, F.M., Mansour, M. & Smilanick, J.L., (2004). Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest. Biol. Technol.* 34(2), 169-77.
- Krause, L., Ellis, M., (1937). A study of the growth of *Penicillium carmino-violaceum* Biourge in media containing ethyl and other alcohols, with a note on the production of pigment by this mould. *Ann. Bot.* 1, 499-513.
- Legan, J.D., (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32(1-3), 33-53.
- Romanazzi, G., Karabulut, O.A. & Smilanick, J.L., (2007). Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest. Biol. Technol.* 45(1), 134-40.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad, O. Filtenborg. (1995). In: R.A. Samson and E.S. van Reenen-Hoekstra (eds.), Introduction to food-borne fungi. 4th ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS, Baarn, The Netherlands, 322p.
- Trinci, A.P.J., (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 57, 11-24.
- Pitt, J.I., and Hocking, A.D., (1999). Fungi and food spoilage. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 593p.
- USDA National Organic Programm., (2001). The national list of allowed and prohibited substances. United States Code of Federal Regulations 7, part 205-601.
- Yuen, C.M.C., Paton, J.E., Hanawati, R. and Shen, L.Q., (1995). Effects of ethanol, acetaldehyde and ethylformate vapour on the growth of *Penicillium italicum* and *P.*

digitatum on oranges. *Journal of Horticultural Science* 70, 81-84.