

## INÉDITO

# Aplicaciones de la tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje en una bodega

Berzosa, Alejandro<sup>1</sup>, Delso, Carlota<sup>1</sup>, Marín-Sánchez, Javier<sup>1</sup>, Maza, Marcos<sup>2</sup>, Álvarez, Ignacio<sup>1</sup>, Sánchez-Gimeno, Cristina<sup>1</sup>, Raso, Javier<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de P.A.C.A., Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza (España)

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias - Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina

\*Autor de contacto: Dr. Javier Raso (Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, c/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, España). Tel.: +34976762675 - Fax: +34976761590 - Email: jraso@unizar.es

Recibido 16 de noviembre de 2023 / Aceptado 2 de diciembre de 2023 / Publicado 1 de enero de 2024

## RESUMEN

Las bodegas pueden aprovechar el efecto de la electroporación provocada por los tratamientos por pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) para la mejora de distintos procesos. La electroporación de las células de la piel de la uva tinta acelera los fenómenos de transferencia de masa que ocurren durante la etapa de maceración/fermentación facilitando la extracción de los compuestos intracelulares como los polifenoles. Por otro lado, la posibilidad de inactivar microorganismos a temperaturas inferiores a las utilizadas en el procesado térmico resulta sumamente atractiva para la descontaminación del mosto o del vino en distintas etapas de su proceso de elaboración. Finalmente, la electroporación de las levaduras desencadena fenómenos hidrolíticos que aceleran su autólisis y permiten reducir el tiempo de crianza sobre lías.

## PALABRAS CLAVE

Pulsos eléctricos de alto voltaje, polifenoles, descontaminación microbiana, crianza sobre lías, manoproteínas, extracción secuencial.

## ABSTRACT

Wineries can take advantage of the effect of electroporation caused by pulsed electric fields (PEF) treatments for the improvement of different processes. Electroporation of red grape skin cells accelerates the mass transfer phenomena that occur during the maceration/fermentation stage, facilitating the extraction of intracellular compounds such as polyphenols. On the other hand, the possibility of inactivating micro-organisms at lower tempera-

tures than those used in thermal processing is extremely attractive for the decontamination of must or wine at different stages of the winemaking process. Finally, the electroporation of yeasts triggers hydrolytic phenomena that accelerate their autolysis and make it possible to reduce the time spent ageing on lees.

## KEYWORDS

Pulsed electric fields, polyphenols, microbial decontamination, aging on the lees, mannoproteins, sequential extraction.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han producido grandes avances tecnológicos en el proceso de elaboración del vino. Sin embargo, para seguir siendo competitivo, el sector se enfrenta a nuevos desafíos como la mejora de la eficiencia de los procesos, la reducción del uso de compuestos químicos o el ahorro en los consumos energéticos. Una de las estrategias para afrontar estos nuevos retos es la introducción de tecnologías de procesado novedosas no utilizadas hasta el momento en las bodegas.

La tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) es un tratamiento físico que consiste en la aplicación intermitente de pulsos de alto voltaje (kV) y de muy corta duración ( $\mu$ s) a un material colocado entre dos electrodos. A pesar de que durante el tratamiento se aplican voltajes de miles de voltios, su duración es del orden de la millonésima parte de un segundo por lo que los requerimientos energéticos del proceso son bajos. El efecto que se consigue al aplicar estos tratamientos es función del campo eléctrico generado entre los dos electrodos,

que se define como el cociente entre el voltaje y la distancia entre los electrodos, y del tiempo de procesado que depende del número de pulsos aplicados y de su anchura (Maza *et al.*, 2019a).

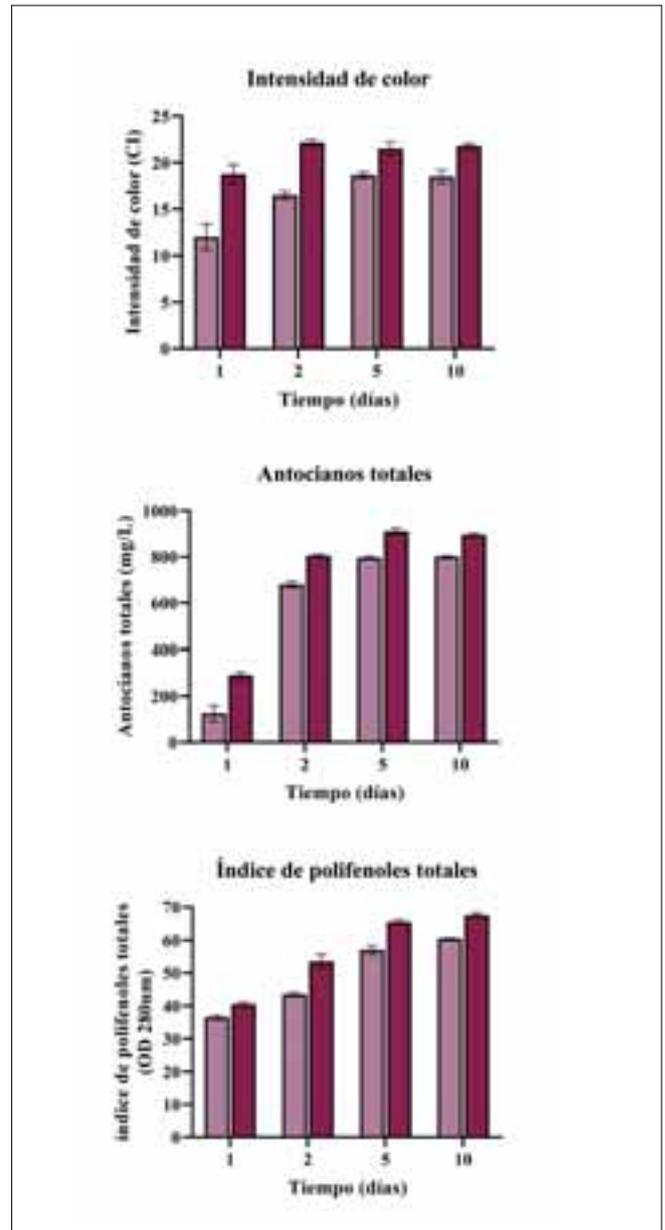
Cuando el campo eléctrico aplicado a un material biológico supera un determinado valor umbral se produce un fenómeno denominado electroporación que consiste en la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células. Como consecuencia, se produce un transporte incontrolado de sustancias a través de la membrana que facilita la extracción de componentes localizados en el citoplasma de las células o provoca la muerte de los microorganismos. El campo eléctrico necesario para afectar a la permeabilidad de la membrana citoplasmática depende del tamaño de las células. Mientras que la electroporación de las células de los tejidos vegetales se consigue con campos eléctricos inferiores a 5 kV/cm, para conseguir electroporar la membrana de las células microbianas se requiere la aplicación de campos eléctricos superiores (>10 kV/cm).

## 2. MEJORA DE LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINO TINTO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA PEF

La maceración de los hollejos de la uva durante la fermentación del mosto es una de las operaciones más críticas en el proceso de elaboración del vino tinto. En esta etapa, se aportan los compuestos polifenólicos, que son claves en la calidad de este tipo de vino ya que son los responsables de muchas de sus propiedades sensoriales, de su capacidad de envejecimiento y de las propiedades beneficiosas para la salud que se atribuyen a su consumo moderado.

En la maceración, los hollejos de la uva están en contacto con el mosto que se está fermentando por las levaduras durante varios días. Ello implica una reducción en la capacidad productiva de la bodega ya que aproximadamente el 25% del volumen de los tanques de fermentación están ocupados por los hollejos. Por otro lado, la presencia de los hollejos provoca que el consumo energético en el proceso de fermentación se incremente debido a que dificultan el control de la temperatura de fermentación y a que se requiere periódicamente realizar remontados para mejorar el contacto de los hollejos con el mosto que está fermentando.

La extracción de los compuestos fenólicos durante el proceso de elaboración de vino tinto requiere tiempos de maceración tan prolongados porque estos compuestos tienen que atravesar la membrana citoplasmática de las células de los hollejos que actúa como una barrera. Distintos estudios han demostrado que la electroporación de esta membrana mediante la aplicación de trata-



**Figura 1.** Evolución de la intensidad de color (CI), antocianos totales (TAC) e índice de polifenoles totales (IPT) durante la maceración-fermentación de uva de la variedad garnacha sin tratar (■) y tratada por PEF (■). Tratamiento PEF: 5 kV/cm, 320  $\mu$ s, 8,8 kJ/kg

mientos PEF facilita la salida de los compuestos fenólicos durante la etapa de fermentación-maceración. El tratamiento se aplica a la uva tras la etapa de despalillado/estrujado previa al proceso de fermentación-maceración.

El efecto del tratamiento PEF en la extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de maceración fermentación se ilustra en la [figura 1](#) donde se compara la intensidad de color, el contenido en antocianos y el índice de polifenoles totales (IPT) durante el proceso de vinificación de una uva sin tratar y tratada por PEF (Maza *et al.*, 2020c). Se observa que los valores de estos tres indi-

ces, que dependen de la extracción de los compuestos fenólicos, fueron mayores en las vinificaciones que se realizaron con la uva previamente electroporada. Las diferencias observadas en los valores de estos índices se mantuvieron hasta incluso transcurridos 10 días de maceración lo que indicaría que el tratamiento PEF no sólo promueve una extracción más rápida de los compuestos fenólicos, lo que permitiría acortar el tiempo de maceración, si no que podría aumentar el contenido de compuestos fenólicos en el vino.

Los resultados obtenidos en pruebas realizadas a escala piloto se han confirmado en estudios realizados a escala semi-industrial. En un estudio realizado por Maza *et al.*, (2019) se procesaron doce toneladas de uvas garracha a un caudal de 2.500 kg. h<sup>-1</sup>, y compararon los vinos obtenidos con uvas sin tratar y tratadas con PEF (4,0 kV. cm<sup>-1</sup>) después de haber mantenido los hollejos en contacto con el mosto que estaba fermentando durante 3 y 6 días. El vino obtenido tras macerar la uva tratada con PEF durante 3 días tenía una intensidad de color, un contenido en antocianos y un índice de polifenoles totales (IPT) similar al obtenido con la uva control tras 6 días de maceración. Se comprobó que la mayor concentración de taninos observada en los vinos tratados con PEF tras 3 días de maceración era debida a un mayor grado de extracción de taninos ubicados en las pieles de la uva, por lo que el tratamiento no promovió la extracción de los taninos de las semillas. Los vinos obtenidos se envejecieron en botella durante un año y también en barrica durante un año y posteriormente durante otro año en botella (Maza *et al.*, 2020b). En ambos casos, el vino elaborado con uva tratada con PEF con tres días menos de maceración evolucionó de manera similar al vino elaborado con la uva sin tratar. Los resultados de los análisis sensoriales mediante pruebas triangulares y de preferencia indicaron que no existía diferencias significativas entre ambos vinos tras su envejecimiento.

Desde 2020, la Organización de la Viña y el Vino (OIV) ha aprobado el uso de los PEF como una nueva práctica enológica para mejorar la extracción de componentes de interés localizados en la piel de los hollejos. (Resolución OIV-OENO 634-2020).

### 3. DESCONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL VINO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA PEF

Los procesos microbianos juegan un papel determinante en el proceso de elaboración del vino. Sin embargo, la

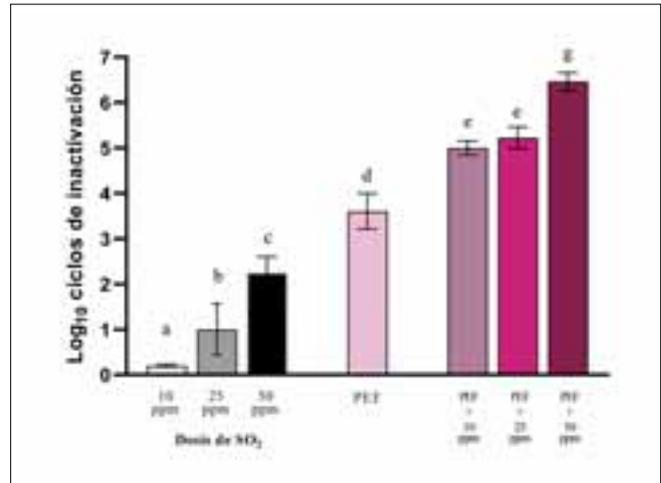


Figura 2. Comparación de la inactivación de *Brettanomyces bruxellensis* en vino tinto por la adición de distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> (10, 25 y 50 ppm), por un tratamiento PEF (15 kV/cm y 78 kJ/kg) y tratamientos combinados de PEF con distintas concentraciones de SO<sub>2</sub> (10, 25 y 50 ppm)

presencia en el vino tanto de los propios microorganismos que han participado en los procesos fermentativos una vez finalizados, como de microorganismos contaminantes representa un riesgo importante que puede afectar a la calidad del producto final, conllevando pérdidas económicas sustanciales.

Las principales estrategias utilizadas por las bodegas para controlar a los microorganismos son el uso de los sulfitos en distintas etapas del proceso de elaboración y la filtración esterilizante antes del embotellado. Sin embargo, el uso generalizado de SO<sub>2</sub> está siendo cuestionado y la filtración esterilizante suele generar controversia debido a su posible impacto en las características químicas y sensoriales del vino.

La tecnología PEF puede representar una alternativa prometedora para el control microbiano en bodegas, ya que puede inactivar microorganismos a temperaturas más bajas que las utilizadas en el procesado térmico. Varios estudios han demostrado el potencial de los tratamientos PEF para inactivar microorganismos involucrados en procesos de fermentación del vino como *Saccharomyces bayanus* y *Oenococcus oeni*, una vez terminada la fermentación o microorganismos alterantes (Puértolas *et al.*, 2009; González-Arenzana *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la viabilidad de estos microorganismos se ve afectada por los tratamientos PEF y que la combinación de SO<sub>2</sub> a bajas concentraciones (10 ppm) con tratamientos de PEF tiene un efecto sinérgico (figura 2). Tratamientos moderados de PEF, ya sea por sí solos o en combinación

# innovación enolviz

Nuestras herramientas te ayudan. Natural.

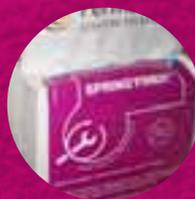


## FILTRACIÓN LIMPIEZA

Parker

PALL

## PRODUCTOS ENOLÓGICOS



## PRENSAS BOMBAS

BUCHER  
vaslin

Cazaux  
rotorflex

## BARRICAS TAPONES



NADALIÉ  
TONNELLERIE



NOMACORC

## INSTALACIÓN INTEGRAL DE BODEGAS

INSTALACIÓN Y EQUIPAMIENTO  
VENTA Y ALQUILER DE MAQUINARIA



944 445 249 

### Nuestro conocimiento y experiencia

Contamos con décadas elaborando con distintas uvas, distintos estados madurez y estados sanitarios. Conocemos nuestras herramientas y los resultados que venimos obteniendo y que nos hacen confiar en nuestras propuestas. Estamos a su disposición para cualquier proyecto enológico. Nuestros técnicos están a su disposición para cualquier consulta.



Enolviz bio-vino es la respuesta a una creciente demanda de productos naturales y saludables, manteniendo sus propiedades y características organolépticas.

[enolviz.com](http://enolviz.com)

#### ENOLVIZ S.L.

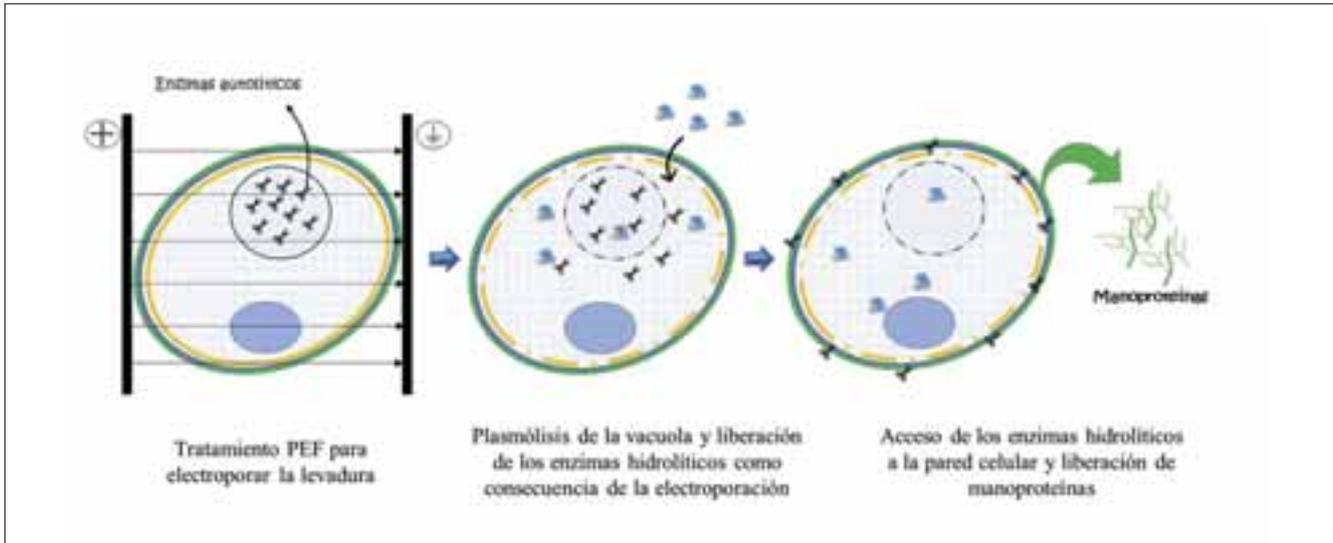
🏠 Alhóndiga de Gaztelondo,  
2ª planta oficina 38  
48002 Bilbao / Bizkaia  
☎ Tel. 944 445 249  
@ enolviz@enolviz.es

#### Sucursales

🏠 PEÑAFIEL / Valladolid  
☎ Tel. 983 880 029  
🏠 FUENMAYOR / La Rioja  
☎ Tel. 941 450 839

Síguenos



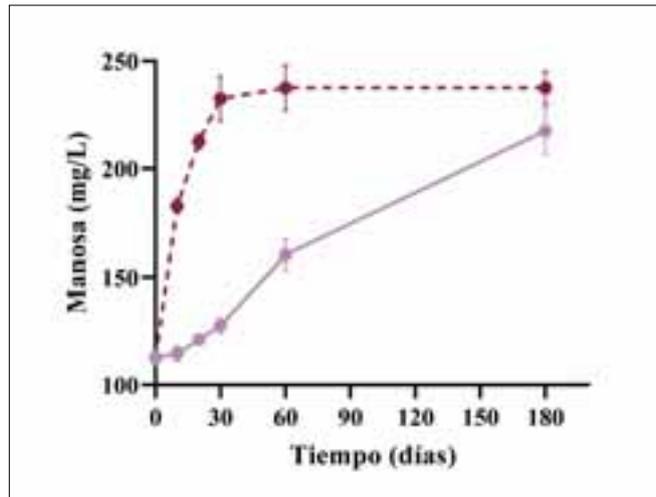


**Figura 3.** Mecanismo por el cual la electroporación de la membrana citoplasmática de las levaduras desencadena su autólisis y acelera la liberación de manoproteínas en el proceso de crianza sobre lías

con dosis subletales de SO<sub>2</sub>, han demostrado ser eficaces en la estabilización microbiológica del vino obtenido en una bodega (Delso *et al.*, 2023b). Además, estos tratamientos no afectan negativamente a los parámetros físico-químicos y sensoriales del vino tinto (Delso *et al.*, 2023a) lo que indica que la tecnología PEF podría representar un proceso físico viable que podría reemplazar o reducir las dosis de SO<sub>2</sub> o servir como alternativa a la filtración esterilizante.

#### 4. APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS PEF PARA ACELERAR LA AUTÓLISIS DE LAS LEVADURAS DURANTE LA CRIANZA SOBRE LIAS

A la presencia de manoproteínas en el vino se le atribuyen numerosos efectos beneficiosos (Pérez-Serradilla y de Castro, 2008). El método tradicional para enriquecer el vino con manoproteínas consiste en mantener las levaduras que han participado en el proceso de fermentación en contacto con el vino. En esta etapa, denominada crianza sobre lías, se produce la autólisis de las levaduras por sus propios enzimas. Entre otros efectos, estos enzimas hidrolíticos desintegran la pared celular de las levaduras liberándose las manoproteínas que representan entre el 25 y el 50% del contenido de esta estructura. La autólisis de las levaduras por sus propios enzimas hidrolíticos es un proceso lento que requiere tiempos de contacto del vino con las levaduras de varios meses. Ello implica costes en mano de obra para la agitación periódica de las lías, la inmovilización de stocks en la bodega



**Figura 4.** Comparación de la liberación de manoproteínas durante la crianza sobre lías de vino de la variedad chardonnay que contenía levaduras sin tratar (—●—) y tratadas por PEF (- -●- -). Tratamiento PEF: 10 kV/cm, 75µs y 9,17 kJ/kg. La liberación de manoproteínas de la pared celular de las levaduras se determinó indirectamente a partir del incremento de la concentración de manosa en el vino tras un tratamiento de hidrólisis ácida

y el aumento del riesgo de deterioro del vino por oxidaciones o por crecimiento microbiano.

Estudios recientes han demostrado que los tratamientos (PEF) pueden inducir la autólisis de *S. cerevisiae* y acelerar la liberación de manoproteínas (Martínez *et al.*, 2016). Este efecto se ha atribuido al hecho de que la electroporación de la membrana citoplasmática de las levaduras, por un lado, modifica la presión osmótica de

Alejandro Berzosa, Carlota Delso, Javier Marín-Sánchez, Marcos Maza, Ignacio Álvarez, Cristina Sánchez-Gimeno, Javier Raso

su citoplasma provocando la plasmólisis de la vacuola y la liberación de enzimas hidrolíticos y, por otro, a través de los poros formados en la membrana citoplasmática se facilita el contacto de estos enzimas con la pared celular donde se encuentran las manoproteínas (figura 3).

El beneficio de la aplicación de un tratamiento PEF para reducir el tiempo de crianza sobre lías se ha demostrado tanto en vino blanco como en vino tinto. La figura 4 muestra que el tratamiento de las levaduras por PEF aceleró considerablemente la liberación de manoproteínas durante la crianza sobre lías de vino de la variedad *chardonnay* (Martínez *et al.*, 2019). Tras 30 días de crianza sobre lías se alcanzó en el vino que contenía levaduras tratadas por PEF la misma concentración de manoproteínas que la que contenía el vino control tras seis meses de crianza sobre lías. Las manoproteínas liberadas por levaduras tratadas con PEF redujeron la turbidez del vino y mostraron propiedades espumantes similares a las liberadas durante el "envejecimiento sobre lías" tradicional. Resultados similares se han observado en la crianza sobre lías de vino tinto (Maza *et al.*, 2020a). Un panel de catadores en un análisis sensorial no fue capaz de encontrar diferencias entre un vino tinto con crianza sobre lías durante un mes con levaduras tratadas por PEF con un vino tinto con una crianza sobre lías tradicional durante 3 meses.

##### 5. USO DE LA TECNOLOGÍA PEF PARA LA REVALORIZACIÓN DE BIOMASA DE LEVADURA GENERADA EN LA FERMENTACIÓN DEL VINO

La elaboración de vino conlleva la generación de grandes cantidades de biomasa de levadura durante la etapa de

fermentación. A pesar de que estas levaduras contienen tanto en su citoplasma (proteínas, vitaminas, ácidos nucleicos, minerales, glutatión y polifenoles) como en las paredes celulares (manoproteínas y  $\beta$ -glucanos) biomoléculas con diferentes aplicaciones industriales apenas se aprovechan.

En estos momentos, siguiendo la estrategia de la economía circular que persigue reducir la generación de residuos mediante su uso para distintas aplicaciones, nuestro grupo de investigación está desarrollando el proyecto PEFRev (PID 2020-113620RB-100) financiado por la Agencia Española de Investigación con objeto de revalorizar la biomasa de levadura generada en procesos fermentativos.

Los resultados obtenidos en este proyecto han demostrado que la tecnología PEF podría contribuir al diseño de un proceso secuencial para obtener un espectro de productos comercializables, a partir del aprovechamiento integral de los componentes de interés de la biomasa de levadura generada en los procesos fermentativos. Gracias a la electroporación de la membrana citoplasmática de las levaduras provocada por el tratamiento PEF, en una primera etapa de extracción, se pueden obtener los componentes localizados en el interior de las levaduras (glutatión, aminoácidos y proteínas). Una vez obtenido el extracto de levadura, en etapas posteriores se pueden obtener los componentes de la pared celular (manoproteínas y  $\beta$ -glucanos) tras su degradación por las propias enzimas de las levaduras activadas como consecuencia del tratamiento PEF (Berzosa *et al.*, 2023).



**BEVZERO**  
BEVERAGE INNOVATION

¿Está listo tu vino 0.0% para Dry January?

- Desalcoholización • Desarrollo de productos
- Equipamiento especializado • Gestión de la cadena de suministro



Aplicaciones de la tecnología de los pulsos eléctricos de alto voltaje en una bodega

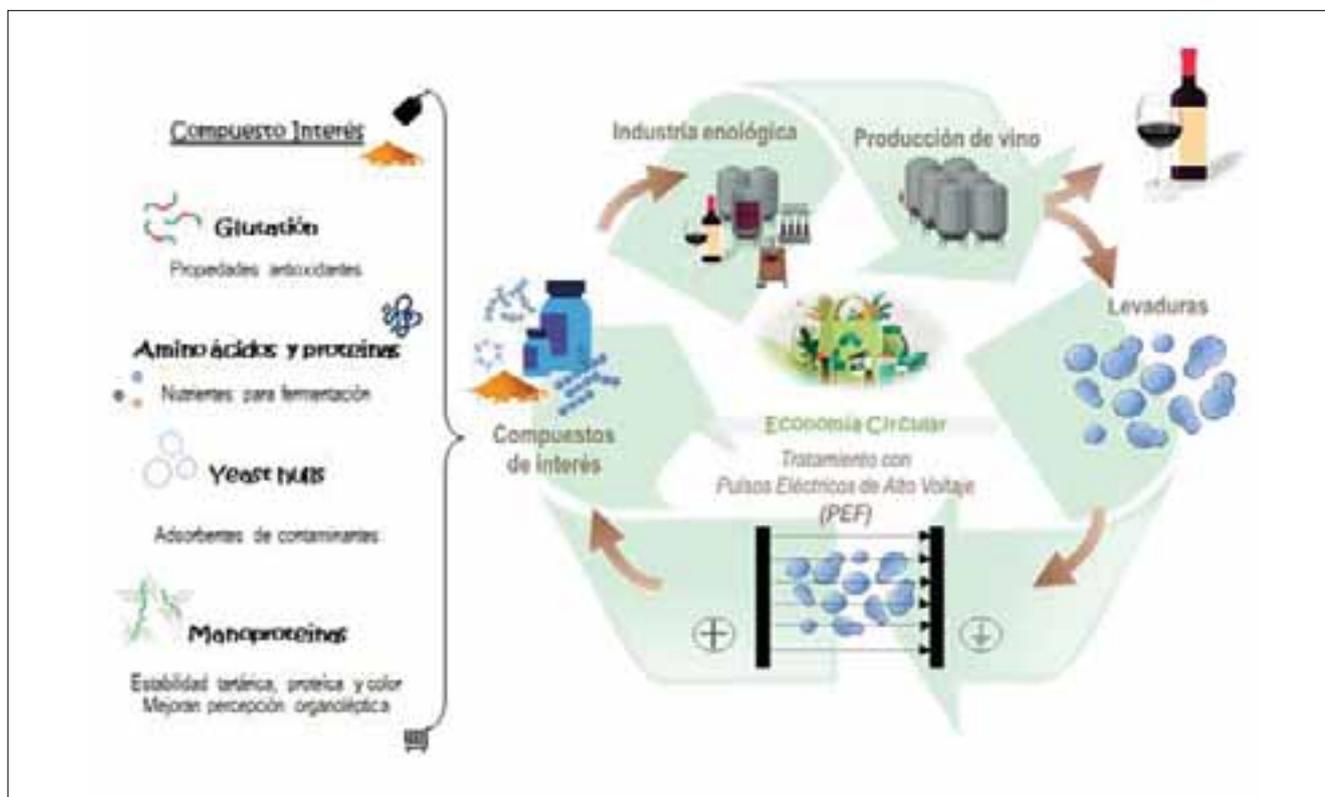


Figura 5. Integración de la tecnología PEF en el concepto de la economía circular con objeto de revalorizar la biomasa de levaduras que participa en procesos fermentativos para la obtención de compuestos con interés en la industria enológica

Una vez demostrado el potencial de la tecnología para el desarrollo de este proceso secuencial se evaluará el uso de los diferentes productos obtenidos en distintos sectores entre los que se encuentra el sector enológico (figura 5).

## 6. CONCLUSIÓN

Como se ha mostrado en este artículo, la tecnología PEF tiene múltiples aplicaciones en bodegas. Se trata de una técnica que además de ayudar a mejorar diversas etapas en el proceso de elaboración de vino puede contribuir a responder a algunas demandas actuales de las bodegas como son la reducción del uso de productos químicos y a la mejora de la eficiencia energética y la sostenibilidad de los procesos enológicos.

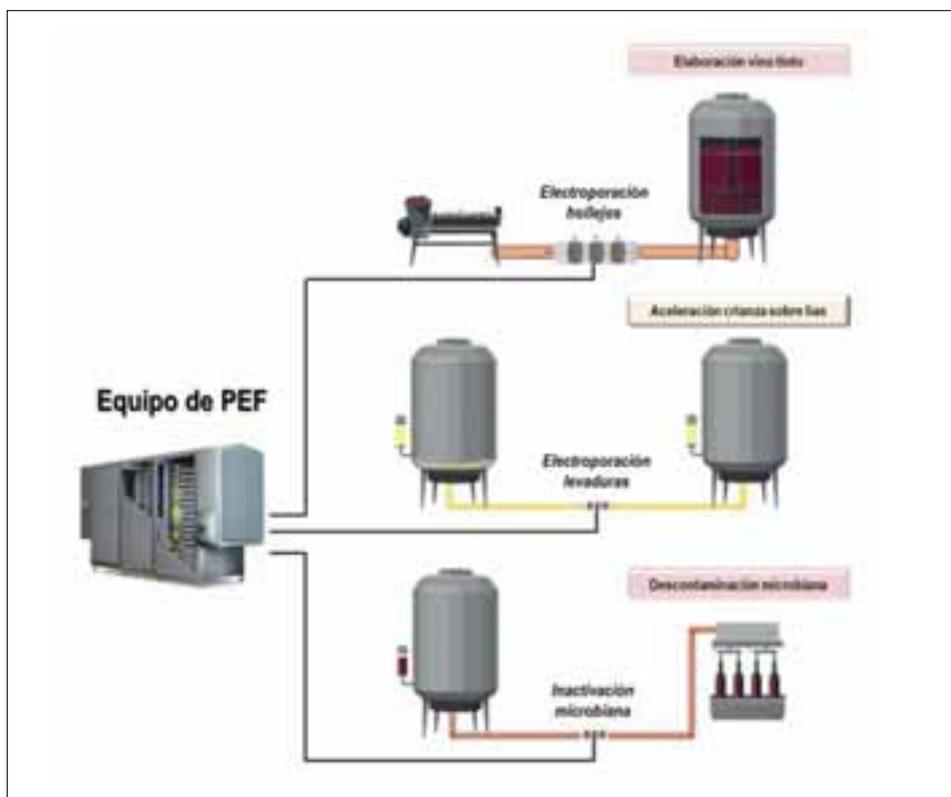
La disponibilidad de equipos comerciales de PEF capaces de responder a los requerimientos de procesados demandados por las bodegas, su fácil implantación en sus instalaciones y la autorización por la OIV de la tecnología PEF como nueva práctica enológica constituyen el impulso definitivo para la implantación de la tecnología de PEF en las bodegas. Es importante señalar que, en una bodega, el mismo generador PEF podría utilizarse para distintas aplicaciones simplemente modificando las dimensiones de la cámara de procesado en función del objetivo del tratamiento (figura 6).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero al proyecto PEFREV (PID 2020-113620RB-100) de la Agencia Española de Investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Berzosa, A., Delso, C., Sanz, J., Sánchez-Gimeno, C., and Raso, J. (2023). Sequential extraction of compounds of interest from yeast biomass assisted by pulsed electric fields. *Front Bioeng Biotechnol* 11. doi: 10.3389/fbioe.2023.1197710.
- Delso, C., Berzosa, A., Sanz, J., Álvarez, I., and Raso, J. (2023a). Microbial Decontamination of Red Wine by Pulsed Electric Fields (PEF) after Alcoholic and Malolactic Fermentation: Effect on *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, and Oenological Parameters during Storage. *Foods* 12. doi: 10.3390/foods12020278.
- Delso, C., Berzosa, A., Sanz, J., Álvarez, I., and Raso, J. (2023b). Pulsed electric field processing as an alternative to sulfites (SO<sub>2</sub>) for controlling *Saccharomyces cerevisiae* involved in the fermentation of chardonnay white wine. *Food Research International* 165, 112525. doi: 10.1016/J. FOOD RES.2023.112525.
- González-Arenzana, L., Portu, J., López, R., López, N.,



**Figura 6.** Implantación de la tecnología de pulsos eléctricos de alto voltaje en una bodega para diferentes aplicaciones

Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., et al. (2015). Inactivation of wine-associated microbiota by continuous pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29, 187–192. doi: 10.1016/J.IFSET.2015.03.009.

-Martínez, J. M., Cebrián, G., Álvarez, I., and Raso, J. (2016). Release of mannoproteins during *Saccharomyces cerevisiae* autolysis induced by pulsed electric field. *Front Microbiol* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01435.

-Martínez, J. M., Delso, C., Maza, M. A., Álvarez, I., and Raso, J. (2019). Pulsed electric fields accelerate release of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* during aging on the lees of chardonnay wine. *Food Research International* 116, 795–801. doi: 10.1016/J.FOODRES.2018.09.013.

-Maza, M. A., Delso, C., Álvarez, I., Raso, J., and Martínez, J. M. (2020a). Effect of pulsed electric fields on mannoproteins release from *Saccharomyces cerevisiae* during the aging on lees of Caladoc red wine. *LWT* 118. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108788.

-Maza, M., Álvarez, I., and Raso, J. (2019a). Thermal and non-thermal physical methods for improving polyphenol extraction in red winemaking. *Beverages* 5. doi: 10.3390/beverages5030047.

-Maza, M. A., Martínez, J. M., Cebrián, G., Sánchez-Gimeno, A. C., Camargo, A., Álvarez, I., et al. (2020b). Evolution of polyphenolic compounds and sensory properties of wines obtained from grenache grapes treated by pulsed electric fields during aging in bottles and in oak barrels. *Foods* 9. doi: 10.3390/foods9050542.

-Maza, M. A., Martínez, J. M., Hernández-Orte, P., Cebrián, G., Sánchez-Gimeno, A. C., Álvarez, I., et al. (2019b). Influence of pulsed electric fields on aroma and polyphenolic compounds of garnacha wine. *Food and Bioprocess Processing* 116, 249–257. doi: 10.1016/J.FBP.2019.06.005.

-Maza, M. A., Pereira, C., Martínez, J. M., Camargo, A., Álvarez, I., and Raso, J. (2020c). PEF treatments of high specific energy permit the reduction of maceration time during vinification of Caladoc and Grenache grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 63, 102375. doi: 10.1016/J.IFSET.2020.102375.

-Pérez-Serradilla, J. A., and de Castro, M. D. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chem* 111, 447–456. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.019.

-Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., and Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int J Food Microbiol* 130, 49–55. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.035.