

Esperienze di inattivazione termica su *Brettanomyces*

Roberto Foschino

DeFENS - Università degli Studi di Milano
Gruppo Italiano Microbiologia del Vino

***Brettanomyces bruxellensis* è il principale agente di alterazione dei vini rossi invecchiati in legno. Nell'industria enologica, la contaminazione da *Brettanomyces* è difficile da gestire, in quanto alcuni ceppi di questo lievito possono sopravvivere e crescere in condizioni proibitive per molti altri microrganismi. L'inattivazione termica mediante l'impiego di acqua calda o di altro mezzo riscaldante sembra però dimostrarsi una tecnica valida per il risanamento microbico delle botti.**

Brettanomyces bruxellensis (specie anamorfa di *Dekkera bruxellensis*) ha assunto una importanza negativa crescente in vinificazione poiché tale lievito è considerato il principale agente di alterazione dei vini rossi da invecchiamento in legno [1, 2].

L'attuale incidenza del difetto definito nota "Brett" non è facile da determinare, in parte perché alcuni enologi sono riluttanti ad ammettere il problema e in parte perché la contaminazione è difficile da rilevare precocemente. Tuttavia analizzando i dati analitici desunti dalla bibliografia [3, 4] e da report tecnici consultati (comunicazioni personali) si può stimare che almeno il 20% dei prodotti sia coinvolto nel fenomeno. La perdita economica per la mancata vendita e il danno reputazionale può dunque essere assai rilevante.

Si ricordi che il deterioramento del vino è dovuto alla capacità di *B. bruxellensis* di produrre fenoli volatili sostanze maleodoranti che derivano da attività enzimatiche consecutive operanti sugli esteri tartarici degli acidi idrossi-cinnamici naturalmente presenti nelle uve [5].

In particolare durante le diverse fasi della vinificazione, dapprima avviene la liberazione degli acidi idrossi-cinnamici dall'acido tartarico ad opera di una cinnammil-esterasi sintetizzata da diversi microrganismi o aggiunta dall'operatore talvolta inconsapevolmente come preparato enzimatico pectinolitico.

Successivamente una cinnammato-decarbossilasi proveniente da alcuni ceppi di lieviti trasforma l'acido p-cumarico in 4-vinilfenolo e l'acido ferulico in 4-vinilguaiacolo. Infine attraverso l'azione di una vinilfenolo-reduccasi espressa specificamente da *Brettanomyces* i vinil-fenoli sono ridotti rispettivamente a 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo. A basse concentrazioni questi composti volatili e soprattutto i vinil-fenoli possono contribuire alla complessità aromatica del vino (descrittori medicinale, pepe, chiodi di garofano, fumo). Invece a concentrazioni superiori alle soglie di percezione, gli etil-fenoli impattano negativamente sul profilo sensoriale del prodotto, conferendo odori assai sgradevoli come puzza di stalla, sudore di cavallo, cuoio, straccio bagnato [2, 6, 7].

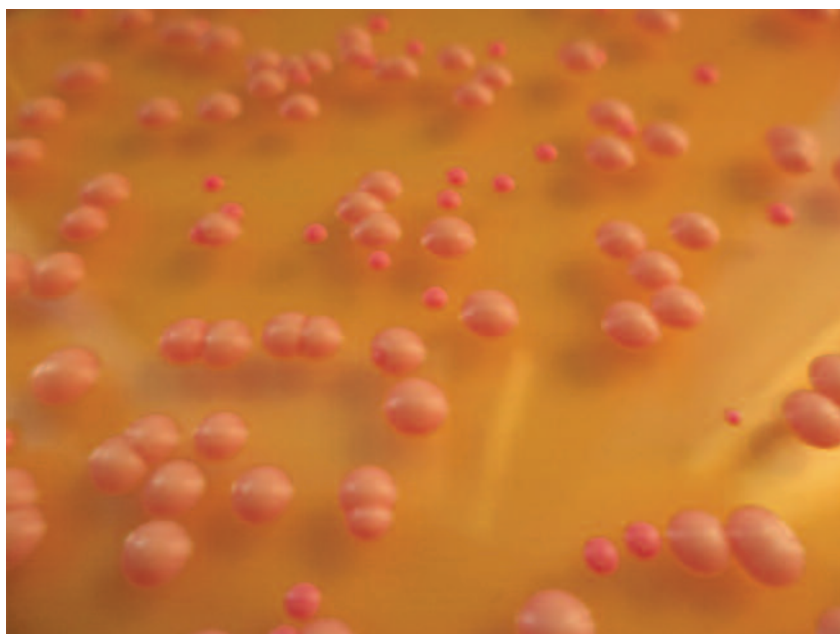


Figura 1 - Colonie di *Brettanomyces bruxellensis*.

foto Bojan Žunar (2015)

Diversi autori hanno confermato il ruolo specifico di tali attività enzimatiche nella formazione del difetto [8, 9, 10]. Di recente il gruppo di ricerca del nostro Dipartimento ha scoperto che la vinil-fenolo-reduttasi di *D. bruxellensis* grazie ad una specifica sequenza aminoacidica agisce sia come reduttasi NADH-dipendente che come superossido dismutasi [11, 12]. Nella Tabella 1 si riportano le soglie di percezione dei fenoli volatili in differenti matrici; i valori riscontrati possono essere assai variabili in funzione del tipo di vino e delle condizioni sperimentali adottate.

Composto chimico	in acqua ($\mu\text{g/L}$)	in vino bianco ($\mu\text{g/L}$)	in vino rosso ($\mu\text{g/L}$)
4-vinil-fenolo	85	100 - 150	200 - 600
4-etil-fenolo	130	50 - 400	60 - 520
4-vinil-guaiacolo	30	30 - 110	40 - 180
4-etil-guaiacolo	20	20 - 50	40 - 140

Tabella 1 - Soglie di percezione dei fenoli volatili in differenti matrici.

Nell'industria enologica la contaminazione da *Brettanomyces* è difficile da gestire in quanto alcuni ceppi di questo lievito sono in grado di sopravvivere e crescere in condizioni proibitive per molti altri microrganismi quali pH basso, concentrazioni elevate di etanolo (fino a 145% v/v) e di SO_2 molecolare (fino a 0,8 mg/L), condizioni di anaerobiosi, scarsa disponibilità di zuccheri (inferiore a 300 mg/L) e di azoto prontamente assimilabile. Oltre alla resistenza agli stress ambientali, *D. bruxellensis* ha sviluppato la capacità di utilizzare il cellobiosio disaccaride che si genera in seguito al trattamento di tostatura delle botti e che viene rilasciato nel vino durante l'invecchiamento [13].

Inoltre alcuni ceppi si sono dimostrati capaci di formare biofilm in diverse condizioni di crescita [14, 15], fenomeno che consente loro di sopravvivere ai consueti trattamenti di sanificazione.

Sebbene il "serbatoio" naturale di questa specie non sia stato ancora definito, l'opinione prevalente è che la sua presenza nella filiera viti-vinicola derivi da una gestione non corretta delle pratiche igieniche nello stabilimento enologico [16, 17].

In realtà il genere *Brettanomyces* è un lievito diffuso nell'ambiente e sebbene minoritario appartiene al microbiota nativo dell'uva [18, 19]; quando entra in cantina, le cellule colonizzano le superfici porose, in particolare il legno delle botti e le parti delle attrezzature che sono difficili da pulire come pompe, tubi, griglie e filtri [20, 21].

Oltre alle consuete operazioni di detergenza, le procedure di sanificazione normalmente applicate ai recipienti vinari di legno prevedono una fase di disinfezione per solfitazione, fatta mediante aggiunta di una soluzione acquosa di metabisolfito oppure di SO_2 in forma gassosa, ottenuta bruciando dischetti di zolfo elementare.

Nei riguardi del vino la prevenzione si esercita attraverso l'adozione della tecnica di filtrazione su membrana (ove possibile) e ancora con l'aggiunta di anidride solforosa. Nondimeno tali pratiche non risultano efficaci a causa della porosità del legno, che limita la capacità di penetrazione dei mezzi chimici, o della presenza e selezione di ceppi solfito-resistenti, o del verificarsi di contaminazioni incrociate nelle operazioni di cantina [16, 20, 22, 23, 24].

Al fine di prevenire e controllare in modo efficace il problema della contaminazione di *Brettanomyces* nelle botti, sono state proposte nuove applicazioni nei protocolli di mantenimento dell'igiene quali l'uso dell'ozono, degli ultrasuoni, l'irraggiamento UV o i raggi gamma [21, 25, 26], comunque con costi di investimento e di gestione non facilmente sopportabili da piccole realtà produttive e con risultati non sempre pienamente positivi.

In effetti tranne che per le radiazioni ionizzanti, l'efficacia dei trattamenti è condizionata dal contenuto di materiale organico presente nella matrice e dal grado di pulizia raggiunto sulla superficie da trattare.

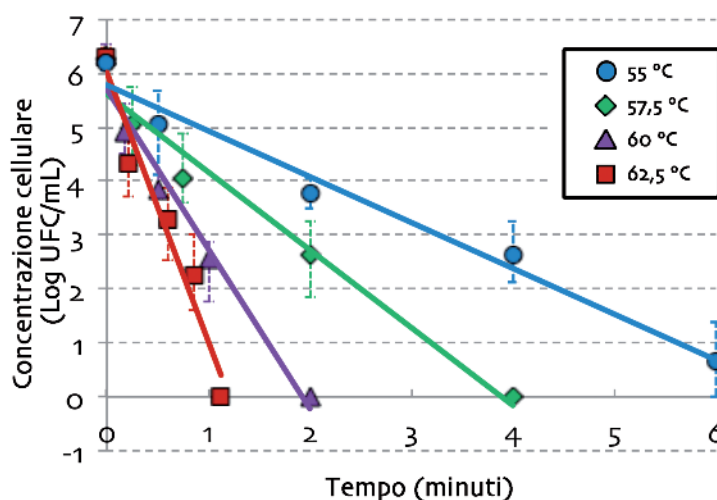


Figura 1 - Linee di inattivazione termica di *D. bruxellensis* in acqua a differenti temperature di trattamento.

L'uso del calore

Tenendo conto della natura fungina di *Brettanomyces* e quindi della intrinseca limitata resistenza delle cellule all'azione del calore, è nata l'idea di impiegare la temperatura come agente microbicida, andando a determinare le cinetiche di inattivazione termica secondo quanto previsto dalle leggi di Bigelow [27, 28].

A questo scopo, sospensioni cellulari a concentrazioni note di quattro ceppi diversi di *D. bruxellensis* sono state sottoposte a differenti trattamenti termici in condizioni controllate [29]. La scelta di saggiare la resistenza al calore delle cellule in acqua è stata dettata dalla supposizione che l'acqua riscaldata potesse essere il mezzo più semplice per erogare calore all'interno delle botti, utilizzando attrezzature già presenti in una normale situazione di cantina quali le lava-barriques.

Nelle prove sperimentali, il trattamento termico delle sospensioni cellulari è avvenuto in capillari di vetro immersi in bagno termostatico agitato, per massimizzare la velocità di trasferimento del calore, che venivano prontamente raffreddati in ghiaccio al termine del tempo prefissato. Il tempo di raggiungimento della temperatura desiderata all'interno del tubo capillare è stato verificato mediante sonda termica. In Figura 1 sono riportate le linee di inattivazione termica ottenute dai valori medi dei ceppi osservate a quattro differenti temperature (55 °C; 57,5 °C; 60 °C; 62,5 °C). Come atteso, si è verificata una diminuzione esponenziale della concentrazione di cellule vitali durante il trattamento e la velocità di morte è stata maggiore alle temperature più elevate.

Il tempo di riduzione decimale (D) e cioè il tempo

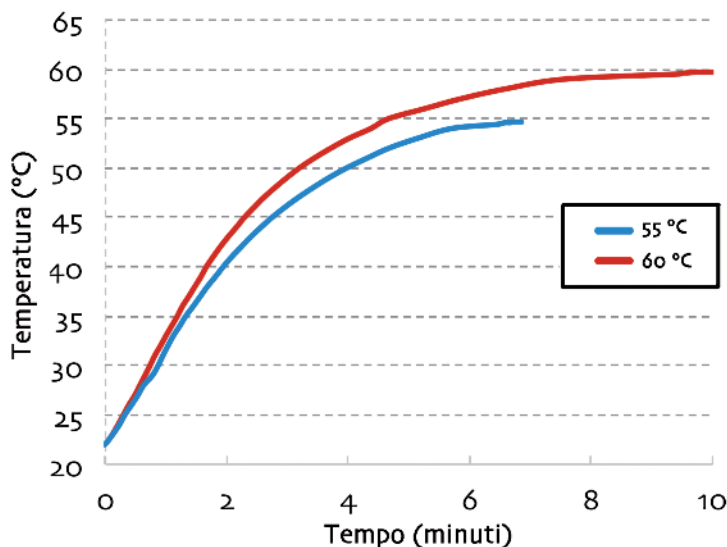


Figura 2 - Profili di penetrazione del calore ad una profondità di 8 mm all'interno di legno di quercia durante differenti trattamenti in acqua.

Temperatura (°C)	D medio (s)	D min (s)	D max (s)
55,0	71	63	79
57,5	42	40	46
60,0	20	19	21
62,5	12	10	14

Tabella 2 - Valori medi minimi e massimi di tempi di riduzione decimale (D espresso in secondi) di *D. bruxellensis* riscontrati a differenti temperature di trattamento in acqua.

in cui viene inattivato il 90% della popolazione cellulare presente, è stato calcolato come l'inverso del coefficiente angolare della retta di regressione che interpola i punti sperimentali per ciascuna delle temperature testate. I valori ottenuti sono esposti in Tabella 2. Il valore di Z, cioè l'incremento di temperatura che consente l'abbattimento di un ordine di grandezza di D, è stato calcolato nella misura di 9,6 °C (valore medio).

La resistenza termica è stata confermata essere un carattere ceppo-specifico. Ad esempio la particolare resistenza al calore del ceppo CBS 2797 potrebbe essere attribuita alla formazione di aggregati cellulari osservata al microscopio in queste condizioni sperimentali [29].

Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile calcolare il tempo di risanamento alle varie temperature nell'ipotesi di una contaminazione assai elevata sullo strato superficiale interno di una botte: per un trattamento con acqua avrebbero potuto essere ritenuti sufficienti 97 minuti a 55 °C; 54 minuti a 57,5 °C; 30 minuti a 60 °C e 17 minuti a 62,5 °C per abbattere di otto cicli logaritmici una popolazione cellulare di *Brettanomyces*.

Tuttavia a questo punto occorre prendere in considerazione due questioni aggiuntive: la prima era fino a che profondità *Brettanomyces* è in grado di penetrare negli strati interni delle doghe? La seconda era quanto tempo aggiuntivo era necessario affinché la temperatura stabilita fosse raggiunta all'interno del legno ove era potenzialmente possibile ritrovare ancora cellule di lievito?

La risposta alla prima domanda ci viene data da un lavoro di Barata e colleghi [30] che hanno osservato la presenza di contaminazione microbica fino a 8 mm corrispondenti al massimo fronte di penetrazione del vino nel legno.

La seconda risposta è stata ottenuta misurando sperimentalmente l'andamento della temperatura a 8 mm di profondità in doghe ricavate da una barrique smontata, mediante l'ausilio di una sonda termica

La propagazione del calore nel legno si è dimostrata essere molto lenta, poiché come previsto questo materiale ha una bassa conduttività termica compresa tra 0,16 e 0,46 W/(m·K) [31]. Quindi, tenuto conto del tempo necessario per raggiungere la temperatura letale scelta (60 °C), negli strati interni in cui il lievito potesse ancora annidarsi e prendendo in considerazione un potenziale tempo di abbattimento di magnitudo di 8 D è stato definito un protocollo di sanificazione termica della superficie con acqua calda alla temperatura di 60 °C per 19 minuti.

Per l'esperimento sono state utilizzate 3 barriques mandate in disuso poiché fortemente sospette di essere contaminate da *Brettanomyces*. Al fine di verificare il tasso di abbattimento microbico, la superficie interna della botte è stata sottoposta ad analisi microbiologiche prima e dopo il trattamento a caldo con acqua. Le concentrazioni di lieviti contaminanti variavano da $2,5 \cdot 10^2$ a $2,3 \cdot 10^6$ UFC/mL nelle sospensioni di risciacquo prima del trattamento, mentre nessuna colonia è stata rilevata in 100 mL dopo il trattamento, dimostrando l'efficacia dell'operazione.

Una vera e propria scoperta dell'acqua calda...

In realtà l'effetto microbocida della alte temperature in procedure di sanificazione di vasi vinari è già impiegato da tempo attraverso la tecnica di trattamento al vapore. È necessario tuttavia tenere presente che l'efficacia del trattamento termico è dipendente dalla durata dell'esposizione all'agente e quindi dal tempo che occorre al materiale per raggiungere la temperatura letale.

In un precedente lavoro, Guzzon et al. [21] confrontarono gli effetti di diversi trattamenti di sanificazione su popolazioni microbiche residenti in barriques: l'uso del vapore si dimostrò più efficace dell'irradiazione UV e simile al trattamento con ozono e l'effetto del vapore era chiaramente correlato al tempo di esposizione dell'agente. È assai probabile che la natura porosa del legno protegga le cellule che stanno in profondità dall'irradiazione UV diretta mentre la presenza di abbondante materia organica all'interno può reagire con l'ozono rendendo questo trattamento meno efficace.

La rimozione delle incrostazioni dalle superfici risulta fondamentale per ottenere un'adeguata disinfezione in ogni caso.

Molto convincenti sono i risultati ottenuti da Schmid et al. [32] che hanno saggiato l'efficacia di un tratta-

mento con ultrasuoni ad alta potenza (17 W/L) per diversi tempi e temperature su doghe contaminate con *B. bruxellensis*. Un'applicazione di 8 minuti in combinazione con acqua a 60 °C comportò la rimozione completa dei depositi di tartrato e una riduzione della popolazione di lievito di tre ordini di grandezza anche con cellule presenti fino a 4 mm di profondità.

Più recentemente è stato presentato uno studio assai interessante da colleghi spagnoli [33] che hanno proposto una nuova applicazione di risanamento delle botti basata sulle tecnologie a microonde ad alta frequenza. Il trattamento è stato effettuato per 3 minuti a 3000 W su doghe smontate di quercia americana (*Quercus alba*) e di quercia francese (*Quercus petraea*) altamente contaminate da differenti microrganismi. La temperatura massima raggiunta alla superficie è stata di 48 °C.

I risultati ottenuti dalle analisi microbiologiche effettuate su campioni di raschiatura di legno raccolti fino a 8 mm di profondità hanno dimostrato l'efficacia del trattamento che rispetto al controllo ha manifestato una riduzione significativa delle popolazioni microbiche presenti. Nell'articolo originale viene riportato un abbattimento percentuale di conte in piastra rispettivamente del 36-38% per i lieviti (35-67% per *Brettanomyces*) del 91-100% per batteri lattici e del 100% per batteri acetici. Per queste valutazioni furono però considerati i valori di carica microbica già trasformati in logaritmi decimali. commettendo una disattenzione nel calcolo che ha nettamente sottostimato il potenziale del trattamento. Infatti se dovessimo rifare i conti e utilizzassimo i valori non trasformati, scopriremmo che la riduzione percentuale delle cariche microbiche fu ben più accentuata e cioè rispettivamente del 97-99% per i lieviti (97-99% per *Brettanomyces*) del 99-100% per batteri lattici e del 100% per batteri acetici.

Conclusioni

In conclusione, l'adozione di un trattamento termico mediante l'impiego di acqua calda o di altro mezzo riscaldante sembra dimostrarsi una tecnica valida per il risanamento microbico delle botti, a patto che si consideri il tempo di mantenimento alla temperatura letale per le cellule e il tempo necessario alla penetrazione del calore nel legno. I valori di D e Z riscontrati sono dati utili alla definizione di qualsiasi protocollo di inattivazione termica di cellule *D. bruxellensis* e colmano una lacuna presente in letteratura [34].

Infine il tipo di intervento proposto appare fattibile in una situazione di cantina comune, non comportando un significativo aumento dei costi e, trovando una soluzione per riciclare l'acqua, potrebbe anche diventare ecologicamente sostenibile.

Bibliografia

- [1] Schifferdecker A. J., Dashko S., Ishchuk O. P., Piškur J. (2014) "The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*" *Yeast* 31 323–332.
- [2] Suarez R., Suarez-Lepe J. A., Morata A., Calderon F. (2006) "The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review." *Food Chem* 102 10–21.
- [3] Agnolucci M., Vigentini I., Capurso G., Merico A., Tirelli A., Compagno C., Foschino R., Nuti M. (2009) "Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines." *Int J Food Microbiol* 130 238–244.
- [4] Campolongo S., Rantsiou K., Giordano M., Gerbi V., Coccolin L. (2010) "Prevalence and biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in wine from Northwestern Italy." *Am J Enol Vitic* 61 486–491.
- [5] Oelofse A., Pretorius I.S., Du Toit M. (2008) "Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review." *S Afr J Enol Vitic* 29 128–144.
- [6] Benito S., Palomero F., Morata A., Caldéron F., Suarez-Lepe J. A. (2009) "Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making." *J Food Sci* 74 16–22.
- [7] Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J-N., Pons M. (1992) "The origin of ethylphenols in wines." *J Sci Food Agric* 60 165–178.
- [8] Godoy L., Martínez C., Carrasco N., Ganga M. A. (2008) "Purification and characterization of a *p*-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*." *Int J Food Microbiol* 127 6–11.
- [9] Hixson J. L., Sleep N. R., Capone D. L., Elsey G. M., Curtin C. D., Sefton M. A., Taylor D. K. (2012) "Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine." *J Agr Food Chem* 60 2293–2296.
- [10] Tchobanov I., Gal L., Guilloux-Benatier L., Remize F., Nardi T., Guzzo J., Serpaggi V., Hervé A. (2008) "Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*." *FEMS Microbiol Lett* 284 213–217.
- [11] Granato T. M., Romano D., Vigentini I., Foschino R., Monti D., Mamone G., Ferranti P., Nitride C., Iametti S., Bonomi F., Molinari F. (2015) "New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*." *Ann Microbiol* 65 321–329.
- [12] Romano D., Valdetara F., Zambelli P., Galafassi S., De Vitis V., Molinari F., Compagno C., Foschino R., Vigentini I. (2017) "Cloning the putative gene of vinyl phenol reductase of *Dekkera bruxellensis* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Food Microbiol* 63 92–100.
- [13] Aguilar Uscanga M. G., Escudero Abarca B. I., Gomez Rodriguez J., Cortes Garcia R. (2007) "Carbon sources and their effect on growth acetic acid and ethanol production by *Brettanomyces bruxellensis* in batch culture." *J Food Proc Engin* 30 13–23.
- [14] Galafassi G., Toscano M., Vigentini I., Zambelli P., Simonetti P., Foschino R., Compagno C. (2015) "Cold exposure affects carbohydrates and lipid metabolism and induces Hog1p phosphorylation in *Dekkera bruxellensis* strain CBS 2499." *Antonie van Leeuwenhoek* DOI 10.1007/s10482-015-0406-6.
- [15] Joseph L. C. M., Kumar G., Su E., Bisson L. F. (2007) "Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*." *Am J Enol Vitic* 58 373–378.
- [16] Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkce R. E. (1996) "Principles and practice of winemaking." Chapman & Hall New York.
- [17] Fugelsang K. C., Edwards C. G. (2007) "Wine Microbiology. Practical applications and procedures." Springer Science Business Media New York U.S.A.
- [18] Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. (2012) "The microbial ecology of wine grape berries." *Int J Food Microbiol* 153 243–259
- [19] Renouf V., Lonvaud-Funel A. (2007) "Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* a spoilage wine yeast on the surface of the grape berries." *Microbiol Res* 162 154–167.
- [20] Coulter A., Robinson E., Cowey G., Francis I. L., Lattey K., Capone D., Gishen M., Godden P. W. (2004) "*Dekkera/Brettanomyces* yeast – an overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control." In: Bell S., de Garis K., Dundon C., Hammito R., Partridge S., Wall G. (eds). ASVO Proc. "Grapegrowing at the Edge Managing the Wine Business Impacts on Wine Flavour Barossa Australia." The Australian Society of Viticulture and Oenology. pp. 51–55.
- [21] Guzzon R., Widmann G., Malacarne M., Nardin T., Nicolini G., Larcher R. (2011) "Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage." *Eur Food Res Technol* 233 285–291.
- [22] Barata A., Caldeira J., Botelho R., Pagliara D., Malfeito Ferreira M., Loureiro V. (2008) "Survival pattern of *Dekkera bruxellensis* in wine and inhibitory effect of sulfur dioxide." *Int J Food Microbiol* 121 201–207.
- [23] Curtin C. D., Kennedy E., Henschke P. A. (2012) "Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates." *Lett Appl Microbiol* 55 56–61.
- [24] Vigentini I., Joseph L. C. M., Picozzi C., Foschino R., Bisson L. F. (2013) "Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure." *FEMS Yeast Res* 13 597–608.
- [25] Gracin L., Krizanovic S., Rezek Jambrak A., Tomasevic M., Kovacevic Ganic K. (2017) "*Brettanomyces* population in wine. Influence of ultrasound treatment." *J Biotechnol* 256S S5–S16.
- [26] Guzzon R., Nardin T., Micheletti O., Nicolini G., Larcher R. (2013) "Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine." *Austr J Grape Wine Res* 19 180–188.
- [27] Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A. (2005) "Modern food microbiology." 7th Edition Springer Science Business Media New York.
- [28] Stumbo C. R. (1973) "Thermobacteriology in Food Processing." Academic Press New York.
- [29] Fabrizio V., Vigentini I., Parisi N., Picozzi C., Compagno C., Foschino R. (2015) "Heat inactivation of wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by hot water treatment." *Lett Appl Microbiol* 61 186–191.
- [30] Barata A., Laureano P., D'Antuono I., Martorell P., Stender H., Malfeito-Ferreira M., Querol A., Loureiro V. (2013) "Enumeration and identification of 4-ethylphenol producing yeasts recovered from the wood of wine ageing barriques after different sanitation treatments." *J Food Res* 2140–149.
- [31] Lagüela S., Bison P., Peron F., Romagnoni P. (2015) "Thermal conductivity measurements on wood materials with transient plane source technique." *Thermochim Acta* 600 45–51.
- [32] Schmid F., Grbin P., Yap A., Jiranek V. (2011) "Relative efficacy of high-pressure hot water and high-power ultrasonics for wine oak barrel sanitization." *Am J Enol Vitic* 62 519–526.
- [33] González-Arenzana L., Santamaría P., López R., Garijo P., Gutiérrez A.R., Garde-Cerdán T., López-Alfaro I. (2013) "Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: a preliminary study." *Food Control* 30 536–539.
- [34] Couto J. A., Neves F., Campos F., Hogg T. (2005) "Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*." *Int J Food Microbiol* 104 337–344.