(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 221

Zubía 27 221-234 Logroño 2009

INICIO DE LA MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA RIOJANA

ALFONSO V. CARRASCOSA SANTIAGO[1]

RESUMEN

La Rioja es una de las regiones vitivinícolas más importantes del mundo. Por ello fue objeto de estudios científicos sobre microbiología enológica tan pronto como dicha disciplina científica se constituyó. Los conocimientos y el esquema de trabajo de la denominada Escuela de Microbiología de Perugia, al frente de la cual figuraba el Prof. Tomasso Castelli, pudo ser aplicado a los vinos riojanos gracias a la intervención de Juan Marcilla y al trabajo del por entonces joven becario Baldomero Iñigo, que terminaría por enunciar la Teoría Ecológica del Vino en base, entre otros, al trabajo que se comenta en el presente estudio, y que conmemora el 70 Aniversario de la fundación de la institución donde todo se realizó: el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Palabras clave: Historia de la ciencia, microbiología enológica, La Rioja.

La Rioja is one of the most important winemaking regions of the World. By this reason, early after the beginning of the microbiology, wine microbiology was developed and applied to study the wine vinification process of La Rioja wines. The knowledge and microbiological system of study of the named "Escuela de Microbiologia de Perugia", lidered by the Prof. Tomasso Castelli, was used in these studies, after the influence of Juan Marcilla in the scientific career of the Spanish Prof. Baldomero Iñigo Leal, that worked in the Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC during many years, and that was the creator of the named "Teoría ecológica del vino". All these topics are considered in the present article, that also serves to commemorate the 70th anniversary of the creation of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Spanish council of Scientific Research)in this 2009, the institution in wich scientific profession was institutionalization in Spain, and in wich the commented first study about the microbiology of La Rioja wines was made.

Key words: *History of science, wine microbiology, La Rioja.*

1. Dpto. Microbiología. Instituto de Fermentaciones Industriales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 222

INTRODUCCIÓN

La microbiología enológica es la disciplina científica que se encarga de estudiar los microbios del vino. Inició su andadura simultáneamente al inicio de la Microbiología, ya que el genial químico francés, Louis Pasteur, demostró la existencia de los microbios y sus efectos precisamente estudiando la fermentación vínica realizada por las levaduras. Lo describió en 1857 en su famoso trabajo *Mémoire sur la fermentation alcoolique*. Posteriormente elaboraría la teoría microbiana de la transmisión de enfermedades infecciosas, que tantas vidas acabaría salvando. Tal vez fuera en Francia donde primero comenzase la transferencia al sector vinícola de la utilidad de los conocimientos microbianos.

En España a finales del siglo XIX los conocimientos de la microbiología sanitaria se integrarían en las enseñanzas de higiene impartidas en las cátedras de Anatomía Patológica de las Facultades de Medicina, que incluirían unas prácticas de bacteriología a principios del siglo XX. Los establecimientos médicos en los que primero se instalaron microscopios han sido propuestos como los primeros lugares en trabajar en microbiología, contribuyendo así al desarrollo de la denominada medicina de laboratorio (Báguena, 1984a), que defendía la aplicación del microscopio a la patología y a la clínica. También un médico escribiría el primer libro en español de microbiología (Báguena, 1988), y otro fue quien alcanzaría el máximo número de publicaciones de la especialidad en la época (Báguena, 1984b). Pero poco a poco la disciplina científica fue extendiendo su campo de aplicación, y llegaría a alcanzar a la enología, para terminar constituyendo la microbiología enológica.

Durante toda esta época de finales del siglo XIX y hundido por las guerras napoleónicas, el sector vitivinícola español fue recuperándose lentamente. La aparición del oidio y, sobre todo, de la filoxera, en Francia, ocasionó un aumento de la demanda exterior muy grande entre 1860-1870, lo que permitió soñar con hacer de España "la bodega del mundo" (Pan Montojo, 1994). Primando la cantidad sobre la calidad, poco se pensó en cuestiones técnicas o en renovación de instalaciones, y mucho menos en investigación, hasta que la filoxera llegó a España y la demanda exterior disminuyó. El refuerzo químico de la producción, iniciado en 1860, y una tímida renovación técnica que condujo a la diversificación de producto, con el desarrollo de la industria del brandy en Jerez, y del champán en Cataluña, fueron tal vez los principales avances tecnológicos destacables de la época.

El equilibrio no se recuperó hasta la primera década del siglo XX. Al final de la Restauración se comenzó a practicar una política agraria que promovió, entre otras cosas, la vertebración asociativa. Poco a poco la producción de cantidad se vió fortalecida por el inicio de la producción de calidad, y la aplicación de los conocimientos de la Microbiología Enológica fue fundamental para que con ella comenzase el desarrollo de la microbiotecnología alimentaria española. En todo este proceso tuvo mucho que ver el Ingeniero Agrónomo Juan Marcilla (Madrid 1886-1950), con quien surge

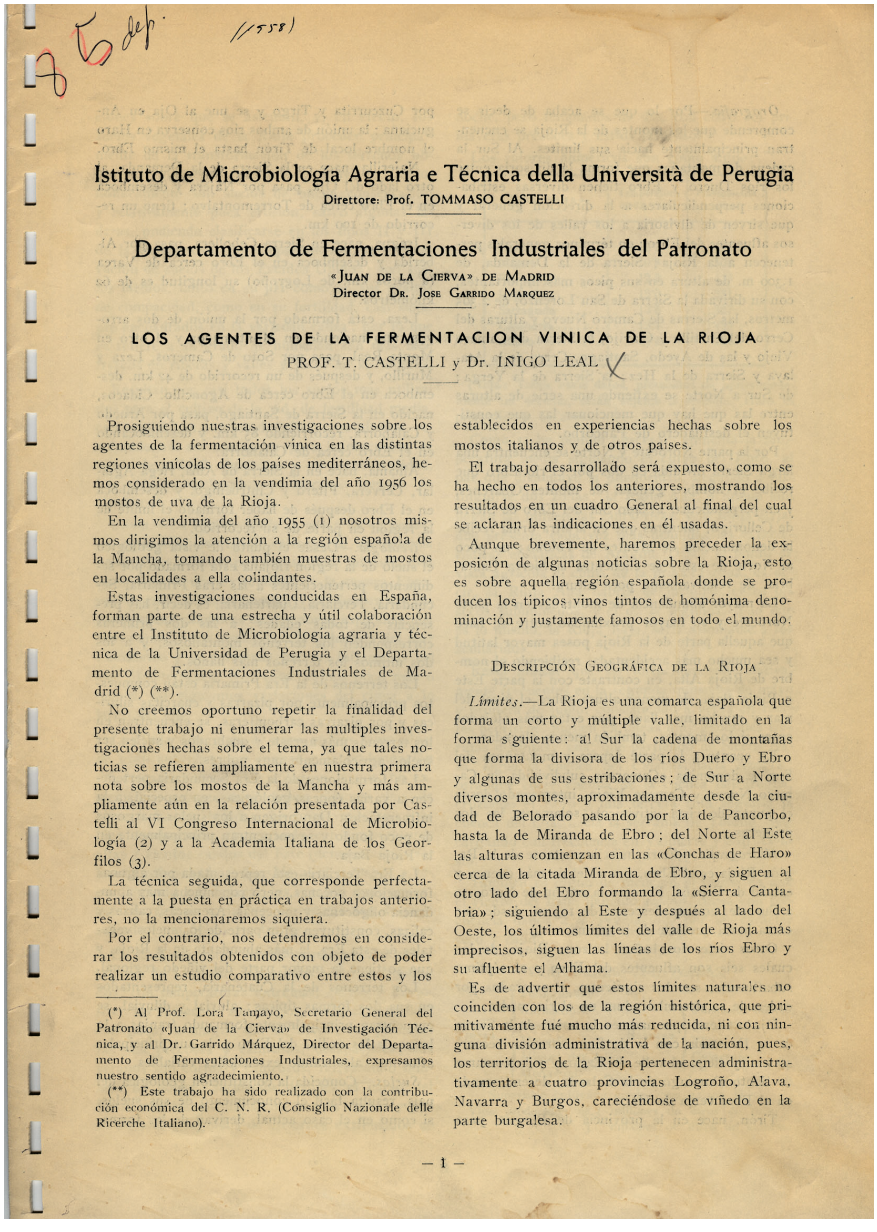
(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 223

la microbiología enológica española como disciplina de investigación científica y asignatura docente universitaria (Carrascosa, 2007, 2008). Escribió los primeros libros en los que los aspectos microbiológicos del vino eran considerados, libros tales como *Vinificación en países cálidos* y *Química, viticultura y enología*, esta última con N. García de los Salmones, ambas publicadas en 1922. Precisamente sería él quien realizaría el primer estudio científico sobre la microbiología del vino español (Marcilla *et al*., 1939), y de la mano de quien se iniciaría la primera ingeniera de España, que además es considerada también la primera enóloga, Isabel Toran del Carre (Carrascosa, 2009), haciendo verdadera política de género con el mérito de llevarla a cabo en aquella época. Su obra magna, y seguramente el libro español más importante en viticultura y enología del siglo XX, publicada en 1942, cuando era Vicepresidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), se tituló *Tratado de viticultura y enología españolas*.

Probablemente fue Marcilla quien trajo a España la microbiología vínica europea. De hecho completó en Francia su formación científica en la Estación Enológica de Montpellier. Dentro del panorama de la nueva disciplina aplicada al vino, comenzaba a destacar el enfoque abordado por los microbiólogos italianos, concretamente la denominada Escuela de Microbiologia de Perugia (ubicada en el Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Universita di Perugia), que se interesaron por describir la realidad especiológica de sus caldos para emplear levaduras seleccionadas en las fermentaciones vínicas. Marcilla, sensible a todos los adelantos y nuevos desarrollos en materia de microbiología enológica, señalaba para España en su obra magna "...aún el muy escaso conocimiento que poseemos acerca de la flora microbiana espontánea en los mostos de uva de cada comarca vitícola". Esta labor por hacer se desarrollaría en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, y al frente de la misma se situaría el Prof. Dr. Baldomero Iñigo Leal, cuyo esfuerzo científico se desarrollaría en la dirección apuntada por Marcilla, y precisamente de la mano del mencionado microbiólogo italiano, el Prof. Tomasso Castelli.

Ha sido puesto de manifiesto que antes de que Iñigo y Castelli comenzasen a trabajar juntos, en el año 1954, con ocasión del Congreso Internacional de Industria Agraria, en Madrid, Castelli expuso los resultados mas relevantes de sus estudios microbiológicos, causando muy buena impresión en Marcilla, que a la sazón era director del Centro de Investigación Enológica del Patronato Juan de la Cierva del CSIC, y que creó la beca que Iñigo ganó para trabajar con Castelli (Iñigo, 1991). Uno de los primeros estudios científicos que realizaron fue precisamente sobre vinos riojanos (Castelli e Iñigo, 1958) (Figura 1).

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 224



Istituto de Microbiología Agraria e Técnica della Università de Perugia
Direttore: Prof. TOMMASO CASTELLI

Departamento de Fermentaciones Industriales del Patronato
«JUAN DE LA CIERVA» DE MADRID
Director Dr. JOSE GARRIDO MARQUEZ

LOS AGENTES DE LA FERMENTACION VINICA DE LA RIOJA

PROF. T. CASTELLI y Dr. IÑIGO LEAL

Prosiguiendo nuestras investigaciones sobre los agentes de la fermentación vinica en las distintas regiones vinícolas de los países mediterráneos, hemos considerado en la vendimia del año 1956 los mostos de uva de la Rioja.

En la vendimia del año 1955 (1) nosotros mismos dirigimos la atención a la región española de la Mancha, tomando también muestras de mostos en localidades a ella colindantes.

Estas investigaciones conducidas en España, forman parte de una estrecha y útil colaboración entre el Instituto de Microbiología agraria y técnica de la Universidad de Perugia y el Departamento de Fermentaciones Industriales de Madrid (*) (**).

No creemos oportuno repetir la finalidad del presente trabajo ni enumerar las multiples investigaciones hechas sobre el tema, ya que tales noticias se refieren ampliamente en nuestra primera nota sobre los mostos de la Mancha y más ampliamente aún en la relación presentada por Castelli al VI Congreso Internacional de Microbiología (2) y a la Academia Italiana de los Georfilos (3).

La técnica seguida, que corresponde perfectamente a la puesta en práctica en trabajos anteriores, no la mencionaremos siquiera.

Por el contrario, nos detendremos en considerar los resultados obtenidos con objeto de poder realizar un estudio comparativo entre estos y los establecidos en experiencias hechas sobre los mostos italianos y de otros países.

El trabajo desarrollado será expuesto, como se ha hecho en todos los anteriores, mostrando los resultados en un cuadro General al final del cual se aclaran las indicaciones en él usadas.

Aunque brevemente, haremos preceder la exposición de algunas noticias sobre la Rioja, esto es sobre aquella región española donde se producen los típicos vinos tintos de homónima denominación y justamente famosos en todo el mundo.

DESCRIPCIÓN GEOGRÁFICA DE LA RIOJA

Límites.—La Rioja es una comarca española que forma un corto y múltiple valle, limitado en la forma siguiente: al Sur la cadena de montañas que forma la divisora de los ríos Duero y Ebro y algunas de sus estribaciones; de Sur a Norte diversos montes, aproximadamente desde la ciudad de Belorado pasando por la de Pancorbo, hasta la de Miranda de Ebro; del Norte al Este las alturas comienzan en las «Conchas de Haro» cerca de la citada Miranda de Ebro, y siguen al otro lado del Ebro formando la «Sierra Cantabria»; siguiendo al Este y después al lado del Oeste, los últimos límites del valle de Rioja más imprecisos, siguen las líneas de los ríos Ebro y su afluente el Alhama.

Es de advertir que estos límites naturales no coinciden con los de la región histórica, que primitivamente fué mucho más reducida, ni con ninguna división administrativa de la nación, pues, los territorios de la Rioja pertenecen administrativamente a cuatro provincias Logroño, Alava, Navarra y Burgos, careciéndose de viñedo en la parte burgalesa.

(*) Al Prof. Lora Tamayo, Secretario General del Patronato «Juan de la Cierva» de Investigación Técnica, y al Dr. Garrido Márquez, Director del Departamento de Fermentaciones Industriales, expresamos nuestro sentido agradecimiento.

(**) Este trabajo ha sido realizado con la contribución económica del C. N. R. (Consiglio Nazionale delle Ricerche Italiano).

— 1 —

Fig. 1. Carátula de la publicación objeto de estudio.

Núm. 27 (2009), pp. 221-234
ISSN 0213-4306 | Zubía

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 225

1. PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIO SOBRE LA FERMENTACION VINICA EN LA RIOJA

Sería en la vendimia de 1956 (Castelli e Iñigo, 1958) cuando la toma de muestras tendría lugar. Las variedades que entonces se cultivaban en La Rioja, y que se recogen en el estudio, eran tintas tempranillo, garnacho, graciano, mazuelo, Miguel del Arco y monastrell; y blancas garnacho blanco, malvasía, yiura y calagraño, siendo la superficie cultivada de 42.500 hectáreas y el vino producido 98,5 millones de litros de tinto y 3 de blanco. Además, en el artículo se hace una pormenorizada descripción de los aspectos físico químicos de la zona, de su extensión, climatología, orientación, pluviometría, etc., sin dejar de hacer constar las características del suelo o edafológicas, entonces muy tenidas en cuenta en el CSIC, donde se llevó a cabo la institucionalización de dicha disciplina científica de la mano de su Secretario General, el Prof. Albareda. Los suelos fueron calificados de fertilidad media, con más del 15% de caliza y semisecos, aun cuando se reconocía que parte del viñedo estaba asentado en suelos de aluvión.

Los análisis se realizaron sobre los mostos recién elaborados a la salida de la pisadora, denominándose esta primera muestra, primera fase o I, que corresponde al mosto sin fermentar. La segunda o II correspondería con la fase de fermentación tumultuosa del mosto, a los tres-cuatro días de la primera, y la última a los ocho-diez días de la primera, denominada III y tomada tras terminar la fermentación tumultuosa. Sobre las muestras se llevo a cabo el examen microbiológico. Las 23 vinificaciones estudiadas se hicieron con mostos de uva garnacho de Pradejón y Haro –donde también se estudiaron rojal y calagraño-, predominantemente garnacho en Cenicero, San Adrián y La Puebla de La Barca, donde se estudió junto con Fuenmayor mezcla con tempranillo, tempranillo en Igay, mazuelo colerón en Cihuri, malvasía y calagraño en La Puebla de la Barca y vihura en Casa La Reina.

En esta época se aplicaban métodos de estudio fenotípicos con un fuerte componente morfológico, tanto macro como microscópico. El habitual en la Escuela de Perugia era en la época el esquema propuesto por Castelli (Castelli, 1953; Castelli e Iñigo, 1957). Se iniciaba precisamente por la observación microscópica directa de una muestra de mosto, tras colorear con el liquido Ziehl, con la que se percibía el estado general de la vinificacion. A continuación se realizaba el aislamiento en medio sólido, por siembra en agar gelatina-mosto, mezclando partes iguales de gelatina-mosto al 20% con mosto de uva estéril, e incubando a 16-18°C durante 4-5 días, momento en el que se aislaban representantes de las colonias microbianas predominantes, observando cada aislado nuevamente al microscopio, y decidiendo con criterios morfológicos las cepas que eran así consideradas las mayoritarias. Se aislaron en cada fase 4 o 5 cepas, con lo que al final se obtuvieron de 12 a 15 cultivos puros que, en 23 vinificaciones estudiadas, dieron como resultado un cepario de 352 ejemplares.

A partir de aquí, y con un esquema bien definido e inspirado en pruebas bioquímicas de la Escuela Holandesa de Kluyver, en Delft, sistematiza-

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 226

do por Lodder y Kreger van Rij, se estudiaron las cepas aisladas. En cultivo en mosto de uva, agar malta y agar Gorodkowa se observaron la forma, dimensiones y agrupamientos celulares, así como los caracteres culturales (presencia de deposito, anillo, velo o membrana en cultivos líquidos; aspecto consistencia y color en la patina en cultivos sólidos). A continuación se estudio la capacidad de fluidificar la gelatina, mediante picadura en gelatina-mosto de uva y la capacidad de esporular en agar malta o agar Gorodkowa, o sobre yeso o sílice gelatinosa de Castelli.

La caracterización fenotípica se completo con pruebas bioquímicas de fermentación y asimilación de azúcares, asimilación de nitrato y alcohol etílico y medición del poder fermentativo. Todas las características se recogieron en tablas clasificatorias (Tabla 1) y finalmente se le asigno el nombre de la especie a cada cepa aislada.

TABLA 1.

CUADRO DE CLASIFICACIÓN MICROBIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS AISLADAS EN DOS DE LOS MOSTOS DE LA RIOJA ESTUDIADOS

No. de la muestra	Localidad de procedencia	Fase fermentativa	Cepas	Carácter de la colonia	Aspecto microscópico en mosto	Aspecto microscópico en agar-malta	Carácter del cultivo en mosto	Carácter del cultivo en agar-malta	Pintura en gelatina-mosto	Esporificación	Desarrollo en presencia de alcohol etílico	Asimilación de nitratos	Asimilación de: Glucosa	Asimilación de: Galactosa	Asimilación de: Maltosa	Asimilación de: Sacarosa	Asimilación de: Lactosa	Fermentación de: Glucosa	Fermentación de: Galactosa	Fermentación de: Maltosa	Fermentación de: Sacarosa	Fermentación de: Rafinosa	Poder fermentativo	Diagnóstico	Curso fermentativo
7	PRADEJÓN - Solo Garnacho	I	85	MI	A	A	A	A	A	2-3	–	–	+	+	–	+	–	+	+	–	+	1/3	12,87	*Sacch. mangini*	Fermentación realizada por *Sacch. ellipsoideus* con asociación de otras especie esporígenas.
			86	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,00	*Sacch. ellipsoideus*	
			87	M	A	A	A	A	A	2-3-4	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	11,62	*Sacch. ellipsoideus*	
			88	T	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	13,37	*Sacch. ellipsoideus*	
		II	89	M	D	D	A	A	A	1-2	–	–	+	–	+	+	–	+	–	+	+	1/3	12,85	*Sacch. oviformis*	
			90	M	A	A	A	A	A	2	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	13,75	*Sacch. ellipsoideus*	
			91	M	B	B	A	B	A	1-2	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–	+	1/3	6,75	*Torulaspora rosei*	
			92	M	A	A	A	A	A	2	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	10,75	*Sacch. ellipsoideus*	
			93	M	A	A	A	A	A	2	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	11,85	*Sacch. ellipsoideus*	
		III	94	M	A	A	A	A	A	2	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,75	*Sacch. ellipsoideus*	
			95	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	13,75	*Sacch. ellipsoideus*	
			96	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	15,00	*Sacch. ellipsoideus*	
			97	M	G	G	A	A	A	2-3-4	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	11,37	*Sacch. pastorianus*	
			98	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	10,30	*Sacch. ellipsoideus*	
8	PRADEJÓN - Uva tinto Garnacho	I	99	F	C	C	A	C	B	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	4,50	*Kloeckera apiculata*	Inicia *Kloeckera apiculata* y llevar cabo *Sacch. ellipsoideus.*
			100	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	11,80	*Sacch. ellipsoideus*	
			101	M	A	A	A	A	A	3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	14,12	*Sacch. ellipsoideus*	
			102	M	A	A	A	A	A	3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	11,80	*Sacch. ellipsoideus*	
		II	103	M	A	A	A	A	A	3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	13,50	*Sacch. ellipsoideus*	
			104	P	C	C	A	C	B	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	3,20	*Kloeckera apiculata*	
			105	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,00	*Sacch. ellipsoideus*	
			106	F	C	C	A	C	B	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	3,87	*Kloeckera apiculata*	
			107	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	13,25	*Sacch. ellipsoideus*	
		III	108	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,12	*Sacch. ellipsoideus*	
			109	M	A	A	A	A	A	2-3	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,00	*Sacch. ellipsoideus*	
			110	T	A	A	A	A	A	2-3-4	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	12,25	*Sacck. ellipsoideus*	
			111	M	A	A	A	A	A	2	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	1/3	11,75	*Sacch. ellipsoideus*	
			112	F	C	C	A	C	B	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	4,75	*Kloeckera apiculata*	

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 227

2. LOS AGENTES DE LA FERMENTACION VINICA EN LA RIOJA

Las especies de levadura (Figura 2) dominantes en los mostos en fermentación de La Rioja, aisladas en todas las muestras tomadas, fueron principalmente dos: *Saccharomyces ellipsoideus* (142 cepas) y *Kloeckera apiculata* (95 cepas). A continuación se encontró *Torulaspora rosei* (14 mostos, 48 cepas), *Candida pulcherrima* (12 mostos, 24 cepas), *S. pastorianus* (7 mostos, 17 cepas) y otras especies con número muy inferior.

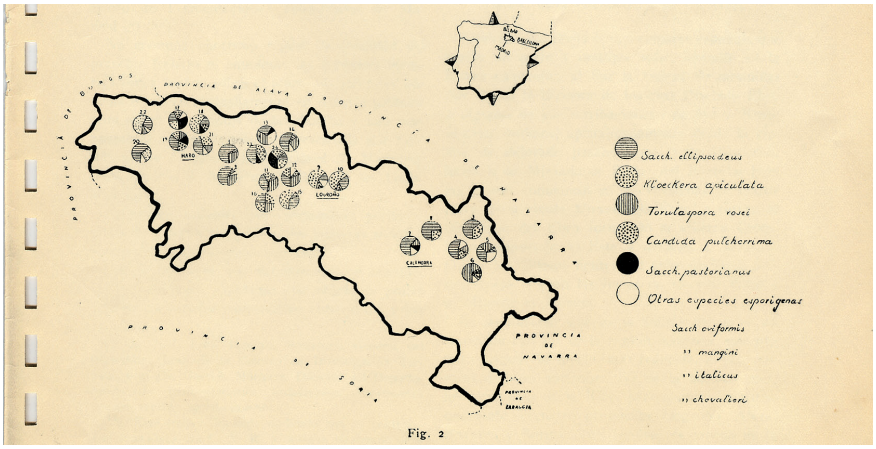


Fig. 2. Distribución geográfica de las especies de las levaduras aisladas durante la vinificación de los mostos de La Rioja estudiados.

TABLA 2.

ESPECIES DE LAS LEVADURAS AISLADAS DURANTE LA VINIFICACIÓN DE LOS MOSTOS DE LA RIOJA ESTUDIADOS, Y PODER FERMENTATIVO DE LAS MISMAS

Especies aisladas	N.º de mostos donde se han encontrado	%	N.º de cepas obtenidas	%	Mínima y máxima producción de alcohol % en volumen	
Sacc. ellipsoideus	24	100,0	142	40,34	8,50	15,00
Kl. apiculata	22	91,6	95	26,29	1,14	7,50
Torulaspora rosei	14	58,3	48	13,63	4,06	8,50
Candida pulcherina	12	50,0	24	6,81	0,10	0,75
Sacc. pastorianus	7	29,2	17	4,85	5,00	12,50
Sacch. oviformis	5	20,8	9	2,84	10,87	12,85
Sacch mangini	5	20,8	8	2,55	10,00	13,25
Sacch. italicus	4	16,6	4	1,13	10,00	12,50
Sacch. chevalieri	3	22,5	3	0,85	11,22	13,75
Sacc. bisporus	1	4,2	1	0,28	8,75	
Torulaspora delbrueckii	1	4,2	1	0,28	8,00	

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 228

C. pulcherrima fue inusualmente frecuente en la primera fase de la fermentación, recién obtenido el mosto, siendo las cepas aisladas escasamente alcoholígenas (0.10-0.75 %) y la especie muy poco frecuente en otras comarcas vitivinícolas españolas. La mayoritaria en la primera fase fué *K. apiculata*, de un nivel alcoholígeno bajo (1.14-7.50 %). Llamó poderosamente la atención que estas especies fuesen las únicas aisladas en los mostos de Ygai, de uva tempranillo, hecho que se comenta como insólito y que de repetirse requeriría la inoculación de dichos mostos con levaduras de mayor poder fermentativo para poder así terminar de transformar los azúcares en etanol, el mosto en vino.

Las especies *Kloeckera apiculata*, *Torulaspora rosei* y *Saccharomyces ellipsoideus*, de bajo, medio y alto poder fermentativo serían la sucesión especiológica típica de la elaboración de los vinos estudiados. La sucesión viene marcada por la etanoltolerancia de las mencionadas especies, directamente proporcional a su capacidad de producir etanol. La secuencia de especies de levadura encontrada en La Rioja correspondió aproximadamente a la misma observada en latitudes similares en Italia (zona central: Umbría, Lacio e Islas de Cerdeña), lo que se comenta como coincidencia de explicación ecológica: la climatología que caracteriza el biotopo determina la composición de la biocenosis. *S. pastorianus* se encontraba en Italia en regiones septentrionales, frías, y se asiló en La Rioja en mayor frecuencia que en otras comarcas vitivinícolas del sur de España.

3. LA RIOJA Y LA TEORÍA ECOLÓGICA DEL VINO

Otra de las preguntas que Marcilla planteaba en su obra magna era la siguiente "...Los especiales gustos y aromas, las calidades todas de un vino dado, ¿pueden ser obtenidas con una sola clase de levaduras puras o son más bien el resultado que deriva, inicialmente y en parte, de una fermentación mixta producida por dos o más especies o razas?", para contestar con la clave que permite entender el posterior estudio sobre vinos de diversas regiones italianas y españolas: " Creemos que jamás se podrá contestar a esta pregunta con carácter de generalidad. Es casi seguro que para muchos vinos comunes bastaría con una levadura pura... pero para los Chianti italianos autoridades como nuestro colega y amigo el prof. Castelli (T.) dudan mucho que puedan ser obtenidas las mejores y más típicas calidades con una sola levadura pura, y es seguro que lo mismo ocurrirá para muchos vinos finos españoles y extranjeros". Este comentario de Marcilla sitúa en Castelli el origen de la idea que subyace en el estudio sobre vinos de La Rioja que acabamos de comentar: la vinificación es obra de varias cepas de levadura que están adaptadas a cada comarca vitivinícola, pertenecientes a varias especies de levadura, y cuya sucesión debería estudiarse e intentar simularse para obtener de forma reproducible los vinos genuinos de cada región, lo que conocemos como vinos con denominación de origen.

Esta idea Castelli la había ya expuesto años antes, mencionando que los estudios de descripción pormenorizada de cepas de levadura durante la vini-

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 229

ficación, si bien es cierto que podrían considerare iniciados en Francia por Pasteur, fueron llevados a cabo de modo exhaustivo en Italia, por la denominada Escuela de Perugia, e iniciados en 1933 por el Prof. Gino de Rossi (Castelli, 1954). Precisamente la idea de Castelli chocaba con la denominada fermentación en pureza, consistente en el empleo de una levadura seleccionada de alto poder alcoholígeno, normalmente perteneciente a la especie *S. ellipsoideus*, idea que comenzaba a imponerse como un modo rápido de hacer vino, copiado del sistema de producción industrial de la cerveza y realmente abominado por Castelli y sus colaboradores. Para la fermentación en pureza, teóricamente útil para fermentar cualquier tipo de mosto, sea cual fuere su origen, se requería haber hecho un uso masivo de antisépticos como plaguicidas contra mohos en la vid, y de la sulfitación del mosto para eliminar levaduras apiculadas de primera fase (*K. apiculata*), consideradas indeseables por aquellos que defendían este tipo de vinificación.

Hoy que tan de moda esta el vino ecológico, pocos saben que los aspectos microbiológicos de su producción fueron concebidos, estudiados y expuestos por Iñigo años atrás, en parte merced a estudios como el que acabamos de resumir. Según la denominada Teoría del Vino Ecológico, término acuñado por el propio Prof. Iñigo aunque absolutamente basado en los enunciados previos de la Escuela de Perugia, el vino ha de ser considerado un proyecto natural único para el hombre (Iñigo, 1986), en el que se suceden el tramo geobotánico, que se inicia en el suelo, pasa por la variedad de vid y produce el fruto, y otro tramo microbiológico, que teniendo su inicio en la microbiota epifítica de la uva, origina la transformación de mosto en vino. Para esta teoría, una comarca vitivinícola sería un ecosistema, en el que viña y microbiota constituirían la biocenosis, condicionando a la aclimatación de la viña la microbiota epifítica de la uva. El mosto en fermentación espontánea seria un subsistema, que produciría un vino ecológico y daría pleno significado al fundamento de la denominación de origen. La forma en la que desde la microbiología se podría perpetuar este sistema pasa por conocer la sucesión de las especies y cepas de la fermentación espontánea, todo lo cual sería utilizado para obtener un vino estable sin la intervención de moléculas químicas extrañas. Dicho en otras palabras, si se ha conseguido identificar un vino propio de Rioja, otro del Penedés, otro de Montilla…se debe al hecho de que tales vinos han sido producidos combinando los tramos geobotánico y microbiológico de modo empírico, han creado una cultura en virtud de la cual pueden distinguirse organolépticamente, y parte de esos caracteres distintivos se deben a la actividad microbiana: haciendo reproducible la microbiología del proceso aseguramos la perpetuación de esa cultura, de ese tipo de vino, en lo que de la microbiota depende. Dado que ha primado la fermentación espontánea del vino sin inoculación de cepa alguna a través de los siglos de producción en La Rioja, el esfuerzo biotecnológico por conservar dicha cultura enológica ha de ser el de reproducir las sucesiones microbianas, más que el de someter la vinificación a la incorporación de microbios ajenos a la misma, o realizarlo con una sola cepa en pureza.

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 230

En términos generales (Castelli, 1954), en el proceso de vinificación espontánea y según la Teoría Ecológica del Vino, se sucederían dos etapas: una anaeróbica y la otro aeróbica. En la primera habría una fase inicial, normalmente dominada por especies del género *Kloeckera*, predominando en España en zonas frías la especie *K. apiculata*, especie eurionica que en zonas cálidas se asociaría a *Hanseniaspora guilliermondii*, y en zonas húmedas con variación de temperatura como La Rioja *Candida pulcherrima*. En la segunda fase la especie eurionica sería *Torulaspora rosei*, acompañada en zonas cálidas con baja humedad ambiental por *Zygossaccharomyces veronae*, y en el Penedés por *Torulaspora bacillaris*. En la tercera fase predominaría la especie eurioica *Saccharomyces ellipsoideus*, que puede presentarse asociada como especie estenotérmica a *S. pastorianus* en zonas frías como La Rioja, y a *S. mangini* y *S. oviformis* como especies estenotérmicas en zonas cálidas. En la fase aeróbica posterior, en zonas cálidas y vinos de elevado grado alcohólico, dominarían especies del género *Saccharomyces* como *S. beticus*, *S. cheresiensis*, *S. rouxii* y *S. montuliensis*, que en zonas con contenido alcohólico limitado se verían acompañadas tanto por especies esporígenas tales como *Hansenula anomala*, *Z. acidifaciens* y *Pichia membranaefaciens*, y asporígenas tales como *C. microderma*, *Criptococcus laurentii* y *Rhodotorula glutinis*. Favorecer la reproducibilidad de estas sucesiones, más que utilizar especies extrañas de levadura seca activa y empleo masivo de antisépticos como el sulfuroso, y hacerlo con cepas autóctonas propias de la denominación de origen, e incluso me atrevería a decir de la bodega, serían garantías para preservar el tipismo de los vinos españoles, según la propuesta de la Teoría del Vino Ecológico.

El Vino Ecológico sería definido como "...el que surge espontáneamente, asumiendo el riesgo de no llegar a ser...", y la elaboración ecológica del vino como "...aquella que respeta el equilibrio biológico inherente a la propia naturaleza del proceso..." asumiendo que "...la estrategia de multiplicidad de acción microbiana genera mecanismos físico-químicos en el vino resultante que cumplen la doble misión de protección frente a la acción oxidativa del aire y a la desestabilizadora biológica de cualquier infección microbiana origen de la enfermedad" (Iñigo, 1986).

La época en la que se fragua la Teoría Ecológica del Vino es un momento en el que está institucionalizándose la ciencia de la ecología en España, momento por tanto propicio para denominar así este nuevo tipo de vino. El entonces secretario general del CSIC, el Prof. Jose María Albareda, experto en la ciencia dedicada al estudio de los suelos, tan importante en viticultura, llamada edafología, fue el principal promotor del desarrollo de la ecología española. El que es considerado pionero en la misma, el hidrobiólogo Celso Arévalo, acabó investigando en el CSIC, donde también lo hicieron el mayor ecólogo español de todos los tiempos, Ramón Margalef, y Fernando González Bernáldez, Pedro Montserrat, Pedro Balcells y un largo etcétera. Además sería el Prof. Albareda quien crearía en 1942 la primera institución española que incluiría la palabra ecología en su nombre, que no sería otra que el Instituto de Edafología, Ecología y Biología Vegetal del CSIC, denominado en la actualidad Centro de Ciencias Medioambientales.

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 231

Gracias a los estudios microbiológicos de Iñigo fue creada la colección de Levaduras del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC, en su día la mayor existente en España, de la que todavía se custodia parte en el Departamento de Microbiología del mencionado instituto, y con la que se siguen llevando a cabo estudios científicos para transferirlas a empresas del sector. De las cepas aisladas en el estudio que hemos considerado todavía se conservan ejemplares. De dicho departamento han salido algunas de las que probablemente deban considerarse más importantes obras escritas sobre microbiología enológica española (Suárez-Lepe e Iñigo, 1988; Bravo, 1995; Carrascosa *et al*., 2005).

La microbiología enológica riojana sigue su actividad, realizándose también en la actualidad en instituciones riojanas. En cuanto a investigación científica, son frecuentes los estudios que se publican llevados a cabo en el CIDA y la Universidad de La Rioja, tanto sobre aspectos zimológicos relacionados con las levaduras de vinificación (Garijo *et al*., 2008; Gutiérrez *et al*., 2001;Santamaría *et al*., 2005, 2008) como sobre aspectos bacteriológicos relacionados con las bacterias lácticas del vino (Navarro *et al*., 2000, 2008), incorporando todos ellos el empleo de técnicas moleculares. La reciente puesta en marcha del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) es más que probable que actúe como catalizador de esta actividad, integrando los esfuerzos de las anteriores instituciones en coordinación con el CSIC, que para el desarrollo de la disciplina incorpora a microbiólogos expertos en ingeniería genética de levaduras vínicas (González-Ramos *et al*., 2008).

AGRADECIMIENTOS

El autor de este artículo cuenta con financiación pública en proyectos del Plan Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (AGL2006-0255, AGL2004-06933-CO2-01/ALI, 25506 FUN C FOOD CONSOLIDER-INGENIO 2010) y de la Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD-CM S-0505/AGR-0153), merced a los cuales desarrolla actividades de investigación científica transferibles a empresas del sector. Los interesados pueden obtener más información en la web www.ifi.csic.es o contactando directamente con el autor.

BIBLIOGRAFÍA

Báguena, Mª J. 1984a. La microbiología en el siglo XIX español: organización de su actividad científica. *Med. Esp*. 83, 180-183.

Báguena, Mª J. 1984b. La microbiología en los artículos de revistas y comunicaciones a congresos de medicina del siglo XIX español. *Rev. Esp. Doc. Cientif*. 7, 29-38).

Báguena, Mª J. 1988. Luis del Río y Lara y la constitución de la microbiología médica en España. *Asclepio* 40, 375-392).

Bravo F. 1995. Del vino y otros temas. *EYPASA*, Madrid.

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 232

Carrascosa, A.V. 2007.: Los orígenes de la microbiología enológica española. *Sem. Vitivin.* 3162, 809-813.

Carrascosa, A.V. 2008. Juan Marcilla: presidente fundador de la SEM. *Actualidad SEM* 45, 16-21.

Carrascosa, A.V. 2009. Isabel Toran: enologa pionera. *Sem. Vitivin.* nº 3261, 42.

Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. 2005. Microbiología del Vino. *AMV Ediciones*, Madrid.

Castelli, T. 1953. Gli agente Della fermentazione vinaria. Riassunti delle Comunicazione, Volume III, *Sezioni XVII-XXII,* 902, 161-162.

Castelli, T. 1954. Les agents de la fermentation vinaire. *Archiv Mikrobiol.* 20, S. 323-342.

Castelli, T. e Iñigo, B. 1958. Los agentes de la fermentación vínica de La Rioja. *Ann. Fac. Agr. Perugia.* XIV, 1-15.

Castelli, T. e Iñigo, B. 1957. "Los agentes de la fermentación vínica en la región manchega y zonas limítrofes". *Ann. Fac. Agr. Perugia.* Vol. XIII. 17 pp.

Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C. y Gutiérrez, A.R. 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 141-145.

González-Ramos, D., Cebollero, E. y González R. 2008. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environm. Microbiol.* 74, 5533-5540.

Gutiérrez, A.R., Epifanio, S., Garijo, P., López, R. y Santamaría, P. 2001. Killer yeasts: Incidente in the ecology of spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Viticul.* 52, 352-356.

Iñigo, B. 1986. Elaboración ecológica del vino. *Enología y Enotecnia,* 1, 10-13.

Iñigo, B. 1991. Tommaso Castelli e lo sviluppo della microbiologia enologica. *Atti Academia Italiana Della vite e del vino* 423-430.

Marcilla, J., Alas, G. y Feduchy E. 1939. Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. *Anales del Centro de Investigaciones Vinícolas,* Vol. I, nº 1, 1-230.

Navarro, L., Zarazaga, M., Sáenz, J., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88, 44-51.

Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. 2008. Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocinproducing *L. plantarum* J51 strain. *Int. J., Food Microbiol.* 128, 390-394.

Pan Montojo, J. 1994. "La bodega del mundo. La vid y el vino en España, 1800-1936". Alianza/Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

(221-234) 07-ZUBIA 27 14/12/09 10:07 Página 233

Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C. y Gutiérrez, A.R. 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 49-56.

Santamaría, P., López, R., López, E., Garijo, P. y Gutiérrez, A.R. 2008. Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 563-1567.

Suárez-Lepe, J.A. e Iñigo, B. (1988). Microbiología enológica. *Mundi-Prensa,* Madrid.