VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Evaluación de fuentes de nitrógeno en la cinética de crecimiento y producción de exopolisacárido de kéfir de agua en un sistema por lote

Evaluation of Nitrogen Sources on the Growth Kinetics and Exopolysaccharide Production of Water Kefir in a Batch System

Juan Manuel Gallegos Carrillo, Roberto Isaí Navarro Barbosa, Daniela Villagomez Anguiano. Laura Mejía Teniente y Adán Topiltzin Morales-Vargas*
Universidad de Guanajuato
topiltzin.morales@ugto.mx*

Abstract

The development of sustainable biomaterials from renewable sources represents a critical alternative to mitigate environmental pollution caused by conventional plastics. This study comparatively evaluated the impact of various organic and inorganic nitrogen sources (KNO_3, yeast extract, $(NH_4)_2SO_4$, and urea), under iso-nitrogenous conditions equivalent to 0.1 and 0.2 g N/L, on the growth kinetics and substrate consumption of a symbiotic water kefir consortium fed with D-glucose (50.0 g/L) in a in a batch system. During the static screening phases, ammonium sulfate and urea were associated with lower biomass values, suggesting less favorable conditions for the stability of the grain matrix. Conversely, supplementation with KNO_3 and yeast extract at 0.1 g N/L promoted morphological stability and the highest biomass increases. In the high-resolution kinetic phase, the incorporation of an active hydrodynamic regime at 50 rpm and 28 °C optimized mass transfer, reaching a maximum wet biomass of 2.870 g and a glucose assimilation efficiency of 36.81 %, monitored using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay. The exopolysaccharide-rich matrix obtained under these optimal conditions allowed the efficient isolation of kefiran and its subsequent formulation through plasticization with 30 % (w/w) glycerol, successfully yielding a translucent, homogeneous, and visually continuous bio-based film after demolding.

Keywords: Water kefir; Exopolysaccharide; Growth kinetics; DNS; Biofilms.

Resumen

El desarrollo de biomateriales sostenibles a partir de fuentes renovables representa una alternativa crítica para mitigar la contaminación ambiental por plásticos convencionales. En este trabajo se evaluó de manera comparativa el impacto de diversas fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas (KNO_3, extracto de levadura, $(NH_4)_2SO_4$ y urea), bajo distintas concentraciones (0.1 N y 0.2 N), en la cinética de crecimiento y el consumo de sustrato en un consorcio simbiótico de kéfir de agua alimentado con D-glucosa (50.0 g/L) en un sistema por lote. Durante las fases de tamizaje estático, el sulfato de amonio y la urea indujeron un abatimiento del pH del medio que catalizó la hidrólisis de la matriz del grano, provocando pérdidas netas de biomasa. Por el contrario, la suplementación con KNO_3 a 0.1 N y extracto de levadura a 0.1 N promovió la estabilidad morfológica y un incremento en la biomasa. En la fase cinética, la incorporación de agitación constante a 50 rpm y 28 °C optimizó la transferencia de masa, alcanzando una biomasa húmeda máxima de 2.870 g y una eficiencia de asimilación de glucosa del 36.81 %, monitoreada mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La matriz rica en exopolisacáridos obtenida bajo estas condiciones óptimas permitió el aislamiento eficiente de kefirán y su posterior formulación mediante plastificación con glicerol al 30 % (p/p), logrando obtener una biopelícula biobasada translúcida, homogénea y visualmente continua.

Palabras clave: *Kéfir de agua; Exopolisacárido; Cinética de crecimiento; DNS; Biopelículas.*

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Introducción

Los gránulos de kéfir de agua, también denominados históricamente como tibicos, representan un consorcio celular macroscópico inmovilizado de manera natural dentro de una matriz polimérica insoluble (Laureys & De Vuyst, 2014). Dicha infraestructura tridimensional está constituida por un exopolisacárido (EPS) de tipo dextrano helicoidal altamente ramificado, conformado por unidades de D-glucosa, cuya síntesis está coordinada por enzimas glucansucrasas extracelulares de bacterias ácido-lácticas (BAL), destacando especies como Lactobacillus hilgardii (Fels et al., 2018). En los bioprocesos enfocados en la obtención de biomateriales, la retención física de la biomasa microbiana activa en el interior de esta red polimérica es el factor determinante del incremento cinético ponderal del ecosistema simbiótico (Romero-Pérez, 2024).

La viabilidad cinética y la estabilidad estructural del gránulo de kéfir se encuentran fuertemente influenciadas por el balance osmótico y la naturaleza iónica de la fuente de nitrógeno suministrada (Zárate-Romero et al., 2017). La suplementación con nitrato de potasio (KNO_3) puede favorecer condiciones fisiológicas adecuadas para el consorcio, ya que el catión potasio (K^+) participa en procesos de osmorregulación celular y puede actuar como cofactor en rutas metabólicas asociadas al aprovechamiento de carbohidratos. Además, en comparación con fuentes amoniacales, el uso de nitrato podría contribuir a mantener condiciones menos acidificantes para la matriz exopolisacarídica del gránulo (Fels et al., 2018; Sora et al., 2011). En contraste, fuentes orgánicas complejas como el extracto de levadura suministran aminoácidos y cofactores de asimilación directa que aceleran el metabolismo sin requerir rutas de síntesis nucleotídica de novo (Gutiérrez-Ríos et al., 2017). Por el contrario, fuentes como el sulfato de amonio y la urea pueden generar condiciones menos favorables para el consorcio, dependiendo de su asimilación y del efecto que ejerzan sobre el microambiente del gránulo. Estos cambios podrían afectar la estabilidad de la matriz de exopolisacáridos y reflejarse en una menor ganancia de biomasa húmeda (Laureys & De Vuyst, 2014; Zárate-Romero et al., 2017).

A diferencia de los cultivos tradicionales operados en soluciones de sacarosa —los cuales se encuentran termodinámicamente condicionados por la velocidad de difusión e hidrólisis mediada por las invertasas de las levaduras (Sora et al., 2011)—, la alimentación directa de los reactores empleando D-glucosa pura anula estas etapas limitantes de transferencia de masa (Ávila-Reyes et al., 2017). La utilización de este monosacárido de asimilación inmediata optimiza la velocidad específica de crecimiento (mu) al ingresar directamente a las rutas glucolíticas celulares (Ávila-Reyes et al., 2017). No obstante, la maximización de la biomasa húmeda y la posterior secreción del biopolímero funcional requieren un balance estequiométrico preciso mediante la adición de fuentes de nitrógeno asimilable (Zárate-Romero et al., 2017).

El presente artículo tiene como objetivo evaluar de manera comparativa la influencia de fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas sobre la cinética de crecimiento, el consumo de azúcares reductores y la obtención de una matriz exopolisacarídica de kéfir de agua en un sistema de cultivo por lote.



Figura 1. *Granos de kéfir de agua (tibicos) cultivados en medio con glucosa y nitrato de potasio. Fuente: Elaboración propia.*

Materiales y Métodos

Material biológico y estandarización fisiológica del inóculo

Los gránulos de kéfir de agua, también conocidos como tibicos, empleados en este estudio correspondieron a un consorcio microbiano mixto, integrado por bacterias y levaduras, inmovilizado de manera natural en una matriz tridimensional de exopolisacáridos insolubles. Estos fueron adquiridos en un mercado local de Celaya, Guanajuato, México.

Con el propósito de reducir variaciones cinéticas asociadas al origen del inóculo y favorecer una respuesta metabólica homogénea, los gránulos fueron sometidos previamente a una etapa de aclimatación fisiológica. Para ello, el lote madre se inoculó a una densidad del 10 % (p/v) en una solución basal de sacarosa grado analítico al 5.0 % (p/v), preparada con agua purificada comercial. La incubación se realizó en condiciones estáticas a 25 ± 0.5 °C, mediante ciclos sucesivos de 24 h. Al término de la etapa de aclimatación, los gránulos se recuperaron y se enjuagaron dos veces con agua purificada comercial. Posteriormente, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 24 h, previo a su uso en la fase experimental.

Medios de cultivo y condiciones de fermentación

Los sistemas de reacción se prepararon con una concentración fija de D-glucosa de 50.0 g/L, equivalente a 5.0 % (p/v), empleada como fuente única de carbono y energía. Las fuentes de nitrógeno evaluadas fueron sulfato de amonio [$(NH_4)_2SO_4$], nitrato de potasio (KNO_3), extracto de levadura, considerado como fuente orgánica compleja, y urea [$CO(NH_2)_2$].

Las cantidades de cada fuente de nitrógeno se calcularon bajo un criterio iso-nitrogenado, con el propósito de obtener concentraciones equivalentes de nitrógeno elemental de 0.1 y 0.2 g N/L, de acuerdo con el tratamiento experimental correspondiente. De esta manera, las diferencias observadas entre tratamientos podrán atribuirse principalmente al tipo de fuente nitrogenada y no a variaciones en la cantidad total de nitrógeno disponible. Las soluciones de D-glucosa fueron suplementadas individualmente con sulfato de amonio, nitrato de potasio o extracto de levadura (50 mL de volumen de trabajo) y se colocaron en reactores de vidrio de boca ancha con capacidad de 250 mL. Posteriormente, los sistemas se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 min.

Para los tratamientos suplementados con urea se empleó un procedimiento de esterilización por filtración, con el fin de evitar su hidrólisis térmica y la consecuente liberación de amoníaco durante el autoclavado. Para ello, se preparó una solución concentrada de urea de alta pureza, la cual fue esterilizada mediante filtración a través de una membrana estéril de 0.22 µm, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Posteriormente, la solución filtrada se adicionó a la solución estéril de D-glucosa previamente enfriada y se homogeneizó antes de la inoculación.

Diseño experimental y desarrollo del bioproceso

El estudio se desarrolló de manera secuencial durante tres semanas independientes, con el propósito de optimizar el uso de recursos y ajustar el seguimiento de las variables de respuesta. Cada reactor se preparó con un volumen de trabajo de 50 mL y se inoculó con 2.500 g de gránulos de kéfir de agua, previamente lavados con agua destilada y escurridos durante 60 s en un tamiz estéril. Posteriormente, los gránulos se incorporaron al medio de cultivo correspondiente bajo condiciones asépticas. Las tapas metálicas de los reactores se mantuvieron parcialmente aflojadas, aproximadamente un cuarto de vuelta, con el fin de permitir la liberación del dióxido de carbono generado durante la fermentación, sin comprometer las condiciones de asepsia del sistema. Finalmente, todos los reactores se incubaron en oscuridad a 28 °C durante el periodo experimental establecido.

Tamizaje de fuentes de nitrógeno para la evaluación de su asimilación por el consorcio de kéfir de agua

Durante las dos primeras semanas experimentales se realizó una fase de tamizaje con el propósito de evaluar la posible asimilación de distintas fuentes de nitrógeno por el consorcio microbiano presente en los gránulos de kéfir de agua. Esta etapa se planteó debido a que, al tratarse de un sistema microbiano mixto, no se tenía certeza de que todas las fuentes nitrogenadas propuestas pudieran ser consumidas o metabolizadas de manera eficiente por el consorcio.

En la primera semana se evaluó el efecto del sulfato de amonio [$(NH_4)_2SO_4$] sobre el crecimiento del kéfir de agua mediante un diseño unifactorial con tres tratamientos: control, correspondiente a D-glucosa al 5.0 % (p/v) sin adición de nitrógeno; sulfato de amonio equivalente a 0.1 g N/L; y sulfato de amonio equivalente a 0.2 g N/L. Cada tratamiento se realizó con seis réplicas independientes (n = 6), para un total de 18 reactores.

En la segunda semana se evaluaron tres fuentes adicionales de nitrógeno: nitrato de potasio (KNO_3), extracto de levadura y urea [$CO(NH_2)_2$]. Cada fuente se estudió en dos concentraciones, equivalentes a 0.1 y 0.2 g N/L, mediante un diseño en bloques completamente al azar. Cada tratamiento contó con tres réplicas independientes, para un total de 18 reactores.

En ambas semanas, cada reactor se preparó con un volumen de trabajo de 50 mL y se incubó a 28 °C durante 72 h. Al finalizar cada ensayo, se recuperó la biomasa húmeda para determinar el incremento de peso de los gránulos como variable asociada al crecimiento del consorcio.

Cinética de crecimiento bajo condiciones de agitación

A partir de los resultados obtenidos durante la fase de tamizaje, se seleccionaron el nitrato de potasio (KNO_3) y el extracto de levadura como las fuentes de nitrógeno con mejor respuesta para el consorcio de kéfir de agua. Ambas fuentes se evaluaron a una concentración equivalente a 0.1 g N/L.

La fase cinética se desarrolló durante la tercera semana experimental y consistió en la evaluación de tres tratamientos: control, correspondiente a D-glucosa al 5.0 % (p/v) sin adición de nitrógeno; D-glucosa suplementada con nitrato de potasio equivalente a 0.1 g N/L; y D-glucosa suplementada con extracto de levadura equivalente a 0.1 g N/L. Cada tratamiento se realizó con cuatro réplicas independientes (n = 4), para un total de 12 reactores.

Con el objetivo de favorecer la transferencia de masa y mejorar la distribución de nutrientes en el sistema, los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 50 rpm. El experimento tuvo una duración total de 96 h, con muestreos cada 24 h. Durante el ensayo se registró el peso inicial y final de los gránulos, con el propósito de determinar el incremento de biomasa húmeda como indicador del crecimiento del consorcio microbiano.

Metodologías analíticas

Determinación gravimétrica de biomasa

La biomasa húmeda de los gránulos de kéfir de agua se determinó mediante el registro del peso inicial y final de cada inóculo, utilizando una balanza analítica con sensibilidad de ± 0.001 g. Para ello, los gránulos se separaron del medio de fermentación mediante un tamiz estéril y se lavaron con agua destilada para retirar los residuos del medio de cultivo.

Posteriormente, el exceso de humedad superficial se eliminó colocando los gránulos sobre papel absorbente durante 60 s, bajo condiciones estandarizadas para todos los tratamientos. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó el pesaje correspondiente. El incremento de biomasa húmeda se calculó a partir de la diferencia entre el peso final y el peso inicial de los gránulos.

Determinación de azúcares reductores mediante el método DNS

La concentración de azúcares reductores en las muestras de fermentación se determinó mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La concentración de azúcares reductores se calculó a partir de una curva de calibración previamente elaborada con D-glucosa como estándar en un rango de 0 a 1 mg/L. Las muestras obtenidas durante el seguimiento cinético fueron sometidas a reacción con el reactivo DNS y posteriormente calentadas a 100 °C durante 5 min, con el fin de favorecer el desarrollo de la coloración característica. Después del calentamiento, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se transfirieron a una microplaca de 96 pozos. La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas.

Elaboración de biopelículas y plastificación con glicerol

Para la elaboración de biopelículas, los gránulos de kéfir de agua recuperados al finalizar la fermentación fueron sometidos a lavados sucesivos con agua destilada, con el propósito de reducir la presencia de azúcares residuales y otros compuestos solubles retenidos en la matriz del gránulo, los cuales pueden favorecer la absorción de humedad ambiental y modificar las propiedades físicas del material obtenido (Laureys & De Vuyst, 2014; Fels et al., 2018). Posteriormente, el material purificado se empleó para la formación de películas poliméricas, incorporando glicerol como plastificante en una proporción del 30 % (p/p) con respecto al peso seco del exopolisacárido. La adición de glicerol tuvo como finalidad reducir la fragilidad asociada al secado de la matriz polimérica y mejorar la flexibilidad del material, debido a su capacidad para interactuar con las cadenas del polímero, disminuir las interacciones intermoleculares y favorecer una mayor movilidad estructural (Guashca-Cuyo, 2023). La mezcla se homogeneizó, se vertió sobre superficies de moldeo limpias y niveladas, y se dejó secar bajo condiciones controladas hasta la formación de la biopelícula, la cual fue retirada cuidadosamente para su posterior evaluación física y visual (Romero-Pérez, 2024).

Resultados y discusión

Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el incremento de biomasa de kéfir de agua

Los gránulos húmedos de kéfir de agua están constituidos principalmente por agua, la cual representa aproximadamente entre 89 y 90 % de su composición, además de proteínas, lípidos y una matriz estructural formada por exopolisacáridos. Esta organización permite la inmovilización natural del consorcio microbiano y favorece la estabilidad física del gránulo durante el proceso fermentativo.

La suplementación del medio con diferentes fuentes de nitrógeno, bajo concentraciones de 0.1 y 0.2 g N/L, puede modificar la disponibilidad de nitrógeno asimilable para el consorcio microbiano. Este nutriente participa en procesos metabólicos relacionados con la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y el mantenimiento de la estructura del gránulo, por lo que su disponibilidad puede influir directamente en el incremento de biomasa húmeda durante la fermentación.

En la Tabla 1 se presenta la ganancia ponderal promedio de biomasa obtenida después de 72 h de incubación, a partir de un inóculo inicial de 2.50 g de gránulos de kéfir de agua. Los resultados indican que el incremento de biomasa húmeda dependió tanto del tipo de fuente de nitrógeno como de su concentración. Los tratamientos con nitrato de potasio y extracto de levadura favorecieron el crecimiento respecto al control, destacando el nitrato de potasio a 0.1 g N/L como el tratamiento con mayor peso promedio de biomasa (2.875 g), seguido del nitrato de potasio a 0.2 N (2.862 g) y el extracto de levadura a g N/L (2.826 g). Sin embargo, al aumentar la concentración de nitrógeno a 0.2 N se observó una ligera disminución en la ganancia de biomasa, especialmente en el extracto de levadura. En contraste, el sulfato de amonio y la urea presentaron pesos promedio inferiores al control, lo que sugiere una menor asimilación o un posible efecto desfavorable sobre el consorcio microbiano. En conjunto, estos resultados sugieren que las condiciones con nitrato de potasio y extracto de levadura a 0.1 g N/L fueron las más favorables para el crecimiento del kéfir de agua.

Tabla 1. *Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el peso húmedo de gránulos de kéfir a las 72 h.*

Tratamiento	Masa inicial t_0 (g)	Masa final t_{72} (g)	Incremento/Pérdida (g)	Variación (%)
Solo glucosa (Control)	2.500	2.597	+0.097	+3.88
Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1 g N/L	2.500	2.535	+0.035	+1.40
Sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) 0.2 g N/L	2.500	2.459	−0.041	−1.64
Nitrato de potasio (KNO_3) 0.1 g N/L	2.500	2.875	+0.375	+15.00
Nitrato de potasio (KNO_3) 0.2 g N/L	2.500	2.862	+0.362	+14.48
Extracto de levadura 0.1 g N/L	2.500	2.826	+0.326	+13.04
Extracto de levadura 0.2 g N/L	2.500	2.775	+0.275	+11.00
Urea [$CO(NH_2)_2$] 0.1 g N/L	2.500	2.445	−0.055	−2.20
Urea [$CO(NH_2)_2$] 0.2 g N/L	2.500	2.503	+0.003	+0.12

El mejor desempeño observado en los tratamientos con KNO_3 podría relacionarse con la participación del ion potasio (K^+) en procesos de osmorregulación celular y en rutas metabólicas asociadas al aprovechamiento de carbohidratos por el consorcio microbiano (Sora et al., 2011). Asimismo, el uso de nitrato, en comparación con fuentes amoniacales, pudo favorecer condiciones menos desfavorables para la estabilidad de la matriz exopolisacarídica del gránulo (Fels et al., 2018).

Cinética de crecimiento bajo condiciones de agitación

Durante la fase cinética se evaluó el consumo de azúcares reductores en sistemas de cultivo por lote incubados bajo agitación orbital a 50 rpm y 28 °C. Los tratamientos evaluados fueron el control con D-glucosa al 5.0 % (p/v), D-glucosa suplementada con KNO_3 a 0.1 g N/L y D-glucosa suplementada con extracto de levadura a 0.1 g N/L. Los sistemas experimentales empleados se muestran en la Figura 2, donde se observan los reactores de vidrio utilizados para el cultivo por lote.



Figura 2. Sistemas de cultivo por lote empleados para la evaluación cinética del consorcio de kéfir de agua bajo condiciones controladas de incubación. Fuente: Elaboración propia.

La estandarización del método colorimétrico de DNS en microplacas de 96 pozos permitió cuantificar la concentración residual de azúcares reductores a 540 nm. La Figura 3 muestra la curva de calibración elaborada con D-glucosa, la cual se empleó para calcular las concentraciones residuales durante el seguimiento cinético de 96 h. Figura 3. El tratamiento control presentó una disminución limitada de azúcares reductores, pasando de 59.9 a 54.5 g/L, lo que sugiere una menor actividad metabólica asociada a la ausencia de nitrógeno extracelular disponible. En contraste, el tratamiento suplementado con KNO_3 mostró la mayor reducción de azúcares residuales, de 0.524 a 0.331 g/L, seguido del extracto de levadura, que disminuyó de 63.1 a 41.0 g/L.

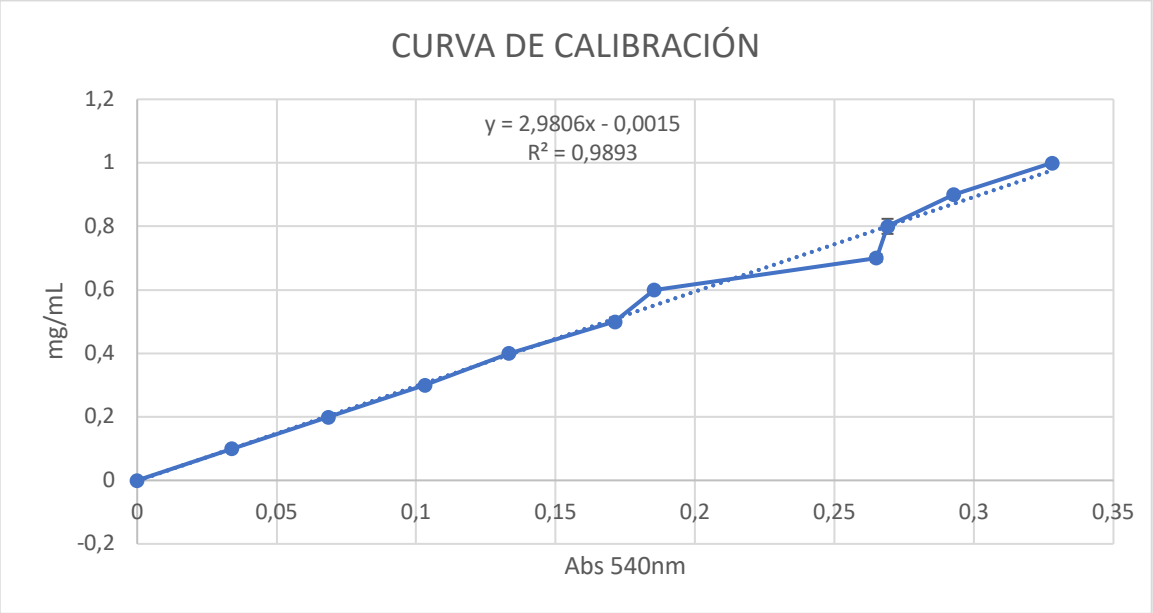


Figura 3. Curva de calibración de D-glucosa mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) medida a 540 nm en microplacas de 96 pozos para el monitoreo de azúcares residuales. Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados indican que la suplementación nitrogenada favoreció el consumo de glucosa por el consorcio microbiano, particularmente en presencia de KNO_3, posiblemente debido a una mejor disponibilidad de nitrógeno asimilable y a una mayor estabilidad del sistema bajo condiciones de agitación moderada. La agitación pudo contribuir a mejorar la transferencia de masa, reducir limitaciones difusionales alrededor del gránulo y favorecer la distribución homogénea de nutrientes, como se ha descrito en sistemas fermentativos con kéfir sometidos a cizallamiento hidrodinámico suave (Ávila-Reyes et al., 2017; Romero-Pérez, 2024).

Como resultado del proceso de purificación y plastificación con glicerol, se obtuvo una biopelícula translúcida y homogénea a partir del exopolisacárido recuperado de los gránulos de kéfir de agua. La película presentó una apariencia continua, sin separación evidente de fases ni zonas marcadas de fractura, lo que sugiere una adecuada integración del plastificante en la matriz polimérica. Este resultado preliminar demuestra la viabilidad del material obtenido para la formación de biopelículas flexibles derivadas del kéfir de agua.



Figura 4. Biopelícula biobasada obtenida a partir de la matriz exopolisacarídica de kéfir de agua y plastificada mediante la adición de 30 % (p/p) de glicerol, mostrando homogeneidad visual y estabilidad durante el desmolde. Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

La suplementación iso-nitrogenada permitió identificar diferencias claras en la respuesta del consorcio de kéfir de agua según la fuente de nitrógeno empleada. El nitrato de potasio y el extracto de levadura, particularmente a 0.1 g N/L, se perfilaron como las fuentes más favorables para promover el crecimiento y conservar la estabilidad estructural de los gránulos.

En contraste, el sulfato de amonio y la urea mostraron una respuesta menos favorable bajo las condiciones evaluadas, por lo que su uso requeriría ajustes adicionales de concentración, pH o condiciones de operación.

Finalmente, la obtención de una biopelícula homogénea y plastificada con glicerol demuestra el potencial del exopolisacárido de kéfir de agua como matriz para el desarrollo de biomateriales microbianos biodegradables.

Bibliografía/Referencias

Arslan, S. (2015). A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA - Journal of Food, 13*(3), 340–345. https://doi.org/10.1080/19476337.2014.981588

Ávila-Reyes, S. V., Londoño-Hernández, L., & Giraldo-Gómez, G. I. (2017). Cinética de síntesis y retención de humedad de biopolímeros bacterianos utilizando monosacáridos puros en reactores de banco. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 16(2), 415–427.

Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydrate Polymers, 189*, 296–303. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037

Gutiérrez-Ríos, M. A., González-Martínez, A., & Cárdenas-López, J. L. (2017). Modelado polinomial y optimización por superficie de respuesta en cultivos bacterianos mixtos. *Revista Politécnica de Ingeniería*, *22*(3), 112–125. https://www.redalyc.org/pdf/776/77642873004.pdf

Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(8), 2564–2572. https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13

Revista Mexicana de Ingeniería Química, 16(2), 415–427.Romero-Pérez, A. L. (2024). Desarrollo y caracterización mecánica de biopelículas funcionales a partir de exopolisacáridos microbianos [Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato]. Repositorio Institucional UG.

Sora, G. T., de Lima, M. J., & de Prado, M. A. (2011). Evaluación cinética del crecimiento de consorcios simbióticos en sistemas cerrados estáticos. *Revista de Microbiología Aplicada*, *14*(2), 89–97. https://www.redalyc.org/pdf/776/77642873004.pdf

Zárate-Romero, P. A., Martínez-Mendoza, J. R., & Sánchez-Ochoa, R. (2017). Optimización de fuentes de nitrógeno para la producción de biomasa celular mediante metodologías de superficie de respuesta. *Vitae*, *24*(1), 34–45. https://www.redalyc.org/pdf/7261/726180839013.pdf