

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE UN BIOESTIMULANTE A BASE DE ÁCIDO  
KÓJICO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR SALINIDAD  
EN PLANTAS DE FRESA

**Tesis**

Que presenta TOMASA QUITERIO GUTIÉRREZ  
como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS EN AGRICULTURA PROTEGIDA

Saltillo, Coahuila

Junio 2023

ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE UN BIOESTIMULANTE A BASE DE ÁCIDO  
KÓJICO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS POR SALINIDAD  
EN PLANTAS DE FRESA

**Tesis**

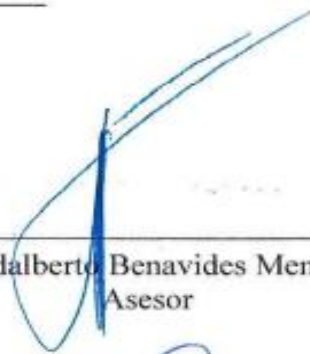
Elaborada por TOMASA QUITERIO GUTIÉRREZ como requisito parcial para obtener  
el grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida con la supervisión y aprobación  
del Comité de Asesoría



Dr. Armando Robledo Olivo  
Director de Tesis



Dra. Susana González Morales  
Asesor



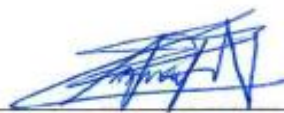
Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor



Dr. José Antonio González Fuentes  
Asesor



Dr. Fabián Fernández Luqueño  
Asesor



Dr. Antonio Flores Naveda  
Subdirector de Postgrado  
UAAAN

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro a esta honorable institución que me abrió sus puertas nuevamente para continuar formándome como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para que fuera posible llevar a cabo mis estudios de postgrado.

Al Dr. Armando Robledo Olivo, por la confianza que me brindó para desarrollar este proyecto de investigación, por compartir sus conocimientos, por la dedicación puesta en la revisión, y por el apoyo continuo durante el trayecto de mis estudios.

A la, Dra. Susana González Morales, por la contribución en este proyecto de investigación, por los comentarios realizados, y las facilidades brindadas en el laboratorio de biología molecular, que sirvieron para mejorar este trabajo.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza, por contribuir en este proyecto de investigación, por el espacio otorgado para establecer el cultivo, y por compartir sus conocimientos.

Al Dr. José Antonio González Fuentes, por su asesoría durante el desarrollo experimental en campo, y su tiempo brindado en este trabajo.

Al Dr. Fabián Fernández Luqueño, por su apoyo en la realización de los análisis minerales, que sirvieron como aporte en este proyecto de investigación.

A la M.C. Alma Leticia Martínez Herrera, por el material que me facilitó para llevar a cabo los análisis en laboratorio.

A mis compañeros de generación: Héctor Rodríguez, Itzel Pérez, Fernando Mejía por haber compartido varios momentos agradables durante nuestra estancia en la universidad, haciendo de esta una experiencia inigualable.

Y un agradecimiento a todos aquellos que intervinieron de alguna manera en la realización de este proyecto de investigación.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Sr. Adrián Quterio Cantero, y mi madre Sra. Remedios Gutiérrez Pérez, quienes siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, y que cada consejo ha sido para mejorar como persona.

A mis hermanos, Gilberto, Adriana, Beatriz, Francisco y Juan Valentín, también a mis sobrinos Karol Viridiana, Ángel Luciano, Matteo Emisael, Diego Saín, Lía Sabina, Camila Mirelle, gracias por siempre estar cuando los necesito, por apoyarme y motivar me siempre a cumplir mis metas.

A José Ángel, quien forma parte de mi vida y con quien he compartido cada uno de mis logros, por tu compañía y por apoyarme siempre. Te amo.

## ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO

Re: [Processes] Manuscript ID: processes-2412725 - Accepted for Publication 

Dear Dr. Robledo-Olivo,

Congratulations on the acceptance of your manuscript, and thank you for submitting your work to Processes:

Manuscript ID: processes-2412725

Type of manuscript: Article

Title: Production of Kojic Acid by *Aspergillus niger* M4 with Different Concentrations of Yeast Extract as Nitrogen Source

Authors: Tomasa Quiterio-Gutiérrez, Susana González-Morales, José Antonio González-Fuentes, Adalberto Benavides-Mendoza, Fabián Fernández-Luqueño, Julia Medrano-Macías, Armando Robledo-Olivo \*

Received: 7 May 2023

E-mails: [tquiterio@hotmail.com](mailto:tquiterio@hotmail.com), [gfb\\_sgm@hotmail.com](mailto:gfb_sgm@hotmail.com), [jagf252001@gmail.com](mailto:jagf252001@gmail.com), [abenmen@gmail.com](mailto:abenmen@gmail.com), [cinves.cp.cha.luqueno@gmail.com](mailto:cinves.cp.cha.luqueno@gmail.com), [jmedmac@gmail.com](mailto:jmedmac@gmail.com), [armando.robledo@uaaan.edu.mx](mailto:armando.robledo@uaaan.edu.mx)

Submitted to section: Pharmaceutical Processes,

[https://www.mdpi.com/journal/processes/sections/Pharmaceutical\\_Processes](https://www.mdpi.com/journal/processes/sections/Pharmaceutical_Processes)

Secondary Metabolites: Extraction, Optimization, Identification and Applications in Food, Nutraceutical, and Pharmaceutical Industries

[https://www.mdpi.com/journal/processes/special\\_issues/Secondary\\_Metabolites\\_Applications](https://www.mdpi.com/journal/processes/special_issues/Secondary_Metabolites_Applications)

[https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review\\_info/a08891711dcdd2fae890cc88ce8121e4](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/a08891711dcdd2fae890cc88ce8121e4)

# ACUSE DE RECIBO DE ENVÍO DE ARTÍCULO

International Journal of Food Science & Technology



## Evaluation of the postharvest quality of strawberries immersed in a fermentation extract rich in kojic acid

Journal:	<i>International Journal of Food Science and Technology</i>
Manuscript ID:	IJFST-2023-37044
Wiley - Manuscript type:	Original Article (Direct Via EEO)
Date Submitted by the Author:	01-May-2023
Complete List of Authors:	Quiterio Gutiérrez, Tomasa; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Protected Agriculture Doctorate Program Robledo, Armando; Antonio Narro Agrarian Autonomous University, Food Science and Technology Gonzalez-Morales, Susana; Universidad Autonoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Quimicas Gonzalez Fuentes, José Antonio; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Horticulture Department Benavides Mendoza, Adalberto; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Horticulture Department CHARLES, ANA VERONICA; Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Food Science and Technology Department Fernández Luqueño, Fabián ; CINVESTAV Coahuila
Keywords:	strawberry, fruit quality, physical-chemical properties, antioxidants

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Institute of Food Science and Technology

## INTRODUCCIÓN

El consumo de fresas como fruta fresca ha aumentado sustancialmente durante las últimas décadas debido a sus beneficios para la salud (Rahman *et al.*, 2018). La fresa se encuentra entre una de las mejores fuentes de compuestos biológicamente activos que contiene, azúcares, vitaminas, minerales y carotenoides, así como ácido ascórbico, compuestos fenólicos y otros antioxidantes (Galli *et al.*, 2016). Los consumidores de fresa pueden obtener mejores beneficios para la salud debido a los niveles elevados de estos metabolitos secundarios (Rahman *et al.*, 2018). El estrés por salinidad es el segundo factor abiótico limitante más crítico y perjudicial que afectan globalmente el crecimiento y el rendimiento de varios cultivos hortícolas (Saidimoradi *et al.*, 2019), como la fresa. El proceso de salinización del suelo se desarrolla de forma natural, ya sea por la meteorización de las rocas madre, la deposición del agua de mar y la deposición atmosférica o mediante procesos secundarios que incluyen, riego con agua subterránea salobre, riego continuo por largas duraciones, manejo inadecuado del agua y métodos culturales en la agricultura de riego (Yaghubi *et al.*, 2019 : Evelin *et al.*, 2019). El metabolismo de las plantas puede verse gravemente afectado por la alta salinidad del suelo y/o el agua de riego (Jamalian *et al.*, 2020). Cuando se produce este tipo de estrés, se ven afectados muchos procesos, como la fotosíntesis, la síntesis de proteínas, las actividades enzimáticas y los metabolismos de lípidos y hormonas (Zahedi *et al.*, 2020). Las altas concentraciones de sal imponen estrés osmótico a través de la membrana plasmática y también reducen el potencial hídrico, lo que limita la disponibilidad de agua y somete a las plantas al estrés por sequía (Baral, 2019). Uno de los efectos nocivos importantes de la salinidad es el daño de tejido foliar que finalmente conduce a la senescencia (Saidimoradi *et al.*, 2019). La mayor incidencia de estrés abiótico conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que podrían ser responsables del efecto adverso sobre el crecimiento, morfología, reducción del rendimiento y la productividad de los cultivos agronómicos (Bali y Sidhu, 2020). La planta de fresa se consideran una especie sensible a la salinidad, aunque existen diferencias en sensibilidad a la salinidad entre cultivares (Jamalian *et al.*, 2019). Los bioestimulantes son productos capaces de actuar sobre los procesos metabólicos y enzimáticos de las plantas mejorando la productividad y la calidad de los cultivos, también

ayuda a las plantas a hacer frente al estrés abiótico, especialmente en la etapa temprana del desarrollo de la planta (Xu y Geelen, 2018). Los bioestimulantes se pueden obtener a partir de microorganismos, este grupo incluye a los hongos filamentosos, bacterias, levaduras y microalgas, los efectos positivos de su aplicación son: mejorar la absorción de nutrientes a través de la fijación de nitrógeno y la solubilización de nutrientes, modifican el estado hormonal al inducir la biosíntesis de hormonas vegetales como las auxinas, citoquininas, además de aumentar la tolerancia al estrés (Bulgari *et al.*, 2019). El ácido kójico (AK) es un agente quelante producido por varias especies de hongos durante la fermentación aeróbica de varios sustratos (Ammar *et al.*, 2017), estudios recientes se han centrado en la producción de AK por microorganismos como métodos alternativos no tóxicos y seguros. El ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona; AK) se ha utilizado como un metabolito secundario útil con múltiples aplicaciones y que es producido por hongos comunes del Género, *Aspergillus*, como *A. oryzae*, *A. tamarri*, *A. parasiticus* y *A. flavus*, además de *Penicillium* y *Acetobacter* (Bentley, 2006 ;El-Kady *et al.*, 2014). Los metabolitos tienen varias funciones, que incluyen la señalización celular, los efectos estimuladores e inhibitorios sobre las enzimas, la actividad catalítica propia, la defensa y las interacciones con otros organismos (Rodríguez, 2016). Por ejemplo, el ácido kójico puede utilizarse para preservar productos agrícolas, particularmente vegetales y frutas, durante el almacenamiento al inhibir la acción de la polifenol oxidasa (PPO) (Promsang *et al.*, 2019), además de que el AK tiene una poderosa actividad antioxidante, se usa ampliamente como conservante y potenciador de sabor (Bala *et al.*, 2015). Debido a la poca información que se tiene sobre el uso de ácido kójico en la fisiología de las plantas, la presente investigación se centró en la aplicación de un extracto a base de ácido kójico obtenido por fermentación líquida por medio de la cepa *A. niger*, con la finalidad de evaluar el efecto bioestimulante en plantas de fresa expuestas a estrés salino, analizando componentes enzimáticos, no enzimáticos y la capacidad antioxidante en el cultivo de fresa.



**Objetivo general**

Evaluar la tolerancia al estrés por salinidad en plantas de fresa mediante la aplicación de un extracto rico en ácido kójico obtenido por fermentación en medio líquido.

**Objetivos específicos**

1. Establecer un sistema de fermentación en medio líquido fomentando el fenómeno de inducción-represión para la síntesis del ácido kójico por una cepa de *Aspergillus* sp.
2. Evaluar la tolerancia al estrés por salinidad en plantas de fresa con la aplicación de un extracto rico en ácido kójico mediante variables agronómicas, fisiológicas y bioquímicas.
3. Analizar la expresión de genes relacionados con la tolerancia al estrés por salinidad en plantas de fresa con la aplicación de un extracto rico en ácido kójico.

**Hipótesis**

La aplicación foliar de un extracto rico en ácido kójico incrementará la tolerancia al estrés por salinidad en el cultivo de fresa.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Importancia del cultivo de fresa**

La fresa (*Fragaria × ananassa* Duch) es una fruta pequeña importante que se cultiva a nivel mundial (Bajpai *et al.*, 2019). México es el tercer proveedor de fresa fresca al mercado internacional, con 14.83% del valor de las exportaciones mundiales. En particular, las exportaciones mexicanas representan 87.79% de las importaciones de Estados Unidos (SIAP, 2016). La fresa se encuentra entre una de las mejores fuentes de compuestos biológicamente activos, con un sabor aceptable, altos niveles de fibra, azúcares, vitaminas, minerales, carotenoides, así como ácido ascórbico, potasio, compuestos fenólicos y otros antioxidantes (Galli *et al.*, 2016), además de posibles propiedades anticancerígenas, por lo que es una planta importante en la nutrición humana (Mozafari *et al.*, 2018).

### **Factores que afectan al cultivo de fresa**

El estrés biótico y abiótico afectan el rendimiento de la fresa y la calidad de la fruta (Bajpai *et al.*, 2019), como el provocado por la sequía, la salinidad, la temperatura extrema, una alta radiación solar y los contaminantes, como metales pesados o pesticidas, producen estrés oxidativo, es decir, un aumento en los niveles celulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kerchev *et al.*, 2020). Los niveles bajos de ROS normalmente se producen por diferentes reacciones durante el metabolismo fisiológico como la fotosíntesis o la respiración, y desempeñan un importante papel de señalización en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bulgari *et al.*, 2019). La alta concentración de sal en el suelo tiene un efecto devastador en el metabolismo de las plantas, al interrumpir la homeostasis celular y desacoplar los principales procesos fisiológicos y bioquímicos (Zou *et al.*, 2019). Las plantas de fresa se consideran especies sensibles a la salinidad, aunque existen diferencias en su sensibilidad a la salinidad entre los cultivares (Jamalian *et al.*, 2020).

### **Estrés salino en plantas**

El estrés salino es una de las amenazas ambientales más graves para la producción de cultivos (Jamalian *et al.*, 2020). La tensión producida por salinidad y en consecuencia el estrés abiótico impuestos reducen de manera importante el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la calidad de los productos comercializables, en consecuencia con pérdidas anuales considerables (Kerchev *et al.*, 2020). Las altas concentraciones de sal imponen estrés osmótico a través de la membrana plasmática y también reducen el potencial hídrico, lo que limita la disponibilidad de agua y somete a las plantas al estrés por sequía (Baral, 2019). Además de generar desequilibrio de nutrientes, debido a una absorción limitada desde el suelo, afectando la calidad nutricional de los cultivos hortícolas (Bulgari *et al.*, 2019). Se ha aceptado que las condiciones salinas normalmente aumentan la absorción del ión sodio ( $\text{Na}^+$ ) al tiempo que disminuyen la absorción de los iones potasio ( $\text{K}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Mozafari *et al.*, 2018). El aumento de los niveles de minerales inorgánicos en el medio ambiente crea estrés osmótico y hídrico, pero al mismo tiempo proporciona un osmoticum barato para reducir el potencial osmótico celular y, por lo tanto, evitar la pérdida de agua (Isayenkov y Maathuis, 2019). Las altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  pueden alterar la textura básica del suelo, lo que resulta en una disminución de la porosidad del suelo y, en consecuencia, reduce la aireación del suelo y la conductancia del agua, una alta disposición de sal en el suelo genera una zona de bajo potencial hídrico, lo que hace cada vez más difícil que las raíces adquieran tanto agua como nutrientes (Manishankar *et al.*, 2018).

### **Mecanismos que activan las plantas para hacer frente al estrés salino**

Las plantas son sésiles y, por lo tanto, tienen que desarrollar estrategias y/o mecanismos adecuados para adaptarse a ambientes con alto contenido de sal. Algunas de las estrategias incluyen una serie de vías de transducción de señales que están involucradas en actividades que van desde la detección del estrés salino, hasta la expresión de diferentes genes que responden al estrés, que regulan procesos, incluida la regulación de la homeostasis iónica, la activación de la vía del estrés osmótico, la mediación de la señalización de hormonas vegetales y la composición de la pared celular (Zhao *et al.*, 2021; Hasanuzzaman y Fujita, 2022).

### **Equilibrio de iones:**

Para tolerar el estrés salino de manera más efectiva, las plantas han desarrollado varios mecanismos reguladores que perciben rápidamente los cambios en las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y la presión osmótica causada por el estrés salino (Ma *et al.*, 2022). Bajo condiciones de estrés salino, las elevadas concentraciones de iones de sodio, se acumulan en las células vegetales, en niveles tóxicos, interrumpiendo la homeostasis de iones. Por su parte, las plantas han desarrollado sistemas para mantener niveles bajos de  $\text{Na}^+$  eliminándolo del citoplasma. Este proceso se realiza por medio de antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que van transportando al  $\text{Na}^+$  a cambio de  $\text{H}^+$ . Los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizados en la membrana plasmática transportan  $\text{Na}^+$  al apoplasto, y los antiportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizados en vacuolas son responsables de mantener la compartimentación de  $\text{Na}^+$  en las vacuolas (Zhao *et al.*, 2021). La vía reguladora hipersensible a la sal (SOS) es esencial para decodificar las señales de calcio inducidas por sal y mantener la homeostasis iónica en la célula vegetal (Ma *et al.*, 2022), mediante la modulación de la actividad de los antiportadores de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  durante el estrés salino. El estrés salino induce la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, de acuerdo a la descripción por Zhao *et al.*, 2021, **1)** El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por monocaciones de glucuronosiltransferasa 1 (MOCA1) es como un canal permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática. **2)** Los esfingolípidos de glucosil inositol fosforilceramida (GIPC) detectan y se unen a  $\text{Na}^+$  para activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por MOCA1. **3)** Los esfingolípidos de glucosil inositol fosforilceramida (GIPC) detectan y se unen a  $\text{Na}^+$  para activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por MOCA1. **4)** El canal iónico dependiente de nucleótidos cíclicos (CNGC) y el transportador de potasio ( $\text{K}^+$ ) de alta afinidad (HKT1) son necesarios para el transporte de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula. **5)** La vía hipersensible a la sal (SOS) desempeña funciones esenciales en la exclusión de  $\text{Na}^+$ . **6)** El sensor de calcio, SOS3/SCaBP8, recluta SOS2 en la membrana plasmática y promueve la fosforilación mediada por SOS2 del antiportador SOS1 de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . En condiciones de estrés salino, SOS3/SCaBP8 percibe el aumento de la señal de calcio citoplasmático y lo transduce a la serina/treonina proteína quinasa corriente abajo, SOS2. SOS3/SCaBP8 recluta SOS2 en la membrana plasmática y la activa. Posteriormente, SOS2 fosforila SOS1, lo que mejora la tolerancia a la sal de la planta al aumentar la actividad de intercambio de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . SOS1 juega un papel clave en el

transporte de  $\text{Na}^+$  desde el citoplasma al apoplasto. La salida de  $\text{Na}^+$  es impulsada por el gradiente de protones que se genera a partir de la membrana plasmática  $\text{H}^+$  ATPasa.

### **Ajuste osmótico:**

La acumulación de iones en el citosol, como compuestos orgánicos, ocurre en condiciones de salinidad/ estrés ocasionando un ajuste osmótico celular. Los solutos son compuestos que no son tóxicos y se encuentran altamente acumulados en el citosol, la función de estos solutos es de protección a las enzimas, las estructuras de membrana, y como un eliminador que reduce a las especies reactivas de oxígeno (Horie *et al.*, 2012), también regulan la presión osmótica al disminuir el potencial osmótico en el compartimento citólico. Algunos de los solutos son: azúcares (sacarosa y fructosa), polioles (sorbitol, manitol, glicerol, arabinitol y pinitol), azúcares complejos (fructanos, trehalosa y rafinosa), iones (predominantemente  $\text{K}^+$ ), proteínas específicas y metabolitos cargados (betaína, prolina, glutamato, aspartato, glicina, colina, putrescina, oxalato y malato (Park y Yun, 2016). El estrés salino y estrés osmótico pueden activar las proteínas quinasas (MAPKKK, MAPKK y MAPK), la activación de las quinasas puede ser tanto dependiente como independientemente de la hormona ácido abscísico, desempeñando un papel importante en la regulación de respuestas de la expresión génica (Zhang *et al.*, 2020).

### **Detección y señalización para regulación del estrés salino en plantas**

Las especies reactivas de oxígeno, a pesar de ser tóxicas, tienen la ventaja de ser moléculas de señalización versátiles, siendo así que las quinasas MAPK, se pueden activar por la acumulación de especies reactivas de oxígeno. La señalización mediada ROS están estrechamente relacionadas con la homeóstasis celular y altamente integrada con las redes de señalización hormonal, permitiendo a las plantas que regulen su proceso de desarrollo (Hanin *et al.*, 2016). El aumento en la generación y la acumulación de ROS, como el peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; oxígeno singlete,  $^1\text{O}_2$ ; radicales superóxido,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ; y radicales hidroxilos,  $\text{OH}\cdot$ , que son altamente reactivos y generalmente tóxicos (Hasanuzzaman y Fujita, 2022), causan daños oxidativos y la peroxidación lipídica de las membranas celulares, y tienen un gran impacto en homeostasis de iones al interferir con los flujos de iones (Hanin *et al.*, 2016). El exceso de ROS es eliminado por medio

componentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el sistema de defensa antioxidante, SOD actúa como componente de los primeros sistemas de defensa en la línea contra las especies reactivas de oxígeno, catalizando la dismutación de dos moléculas de anión superóxido  $O_2^-$  en peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  y oxígeno molecular, lo que hace que el anión superóxido sea menos dañino (Ighodaro & Akinloye, 2018). Posteriormente, CAT y APX eliminan  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). Bajo factores estresantes abióticos es el ciclo ascorbato-glutatión, en el que las isoenzimas ascorbato peroxidasa (APX) desempeñan un papel clave en la catalización de la conversión de  $H_2O_2$ , utilizando ascorbato como donante de electrones específico (Sofó *et al.*, 2015). De acuerdo a la concentración y duración, las afectaciones del estrés salino pueden ir de minutos a días el cual genera estrés osmótico, y de días a semanas que es cuando se genera la toxicidad iónica, la salinidad afectará a las plantas ya sea que algunas sean sensibles o menos sensibles (Soltabayeva *et al.*, 2021).

### **Bioestimulantes**

Los bioestimulantes se definen como: cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y / o los rasgos de calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes (du Jardin, 2015). Los bioestimulantes tienen varios ingredientes para promover el crecimiento y el desarrollo de las plantas cuando se aplican en una pequeña cantidad, y se clasifican principalmente en siete clases que incluyen ácido húmico (HA) y ácido fúlvico (FA), hidrolizados de proteínas (PH), extractos de algas marinas, quitosano, compuestos inorgánicos, hongos y bacterias beneficiosas (du Jardin, 2015; Xu & Geelen, 2018). Los bioestimulantes promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, desde la etapa de semilla hasta plantas maduras, mejorando la eficiencia metabólica, generando mayor rendimiento y mejor calidad de cultivo, facilitando la asimilación y translocación de nutrientes (Ali *et al.*, 2019). Los bioestimulantes se pueden obtener a partir de microorganismo, este grupo incluye hongos filamentosos, bacterias, levaduras y microalgas (Bulgari *et al.*, 2019). Entre otras definiciones expuestas, se encuentra la descrita por la Unión Europea (UE), que refiere a un bioestimulante vegetal, como un producto fertilizante cuya función sea estimular los procesos de nutrición de las plantas independientemente del contenido de nutrientes del producto con el único objetivo de

mejorar una o varias de las siguientes características de la planta o de la rizosfera vegetal: a) eficiencia en el uso de nutrientes, b) tolerancia al estrés abiótico, c) rasgos de calidad, d) disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizosfera UE 2019/1009 (UE, 2019). Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por la UE, en referencia a los bioestimulantes de origen microbiano, solo enumera a bacterias como *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Rhizobium* spp. y hongos micorrízicos como microorganismos adecuados, y aunque no están incluidas dentro de su reglamento existen diferentes cepas de hongos no micorrízicos reportados como hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF), los cuales de acuerdo a lo reportado por Spinelli *et al.*, 2022 deberían ser considerados por el efecto bioestimulante que generan en la planta al ser aplicados.

## MICROORGANISMOS

### *Aspergillus* sp.

Los hongos filamentosos de *Aspergillus* producen metabolitos secundarios, que han sido ampliamente estudiados por sus funciones cruciales en la salud humana, la medicina y la industria (Siddiquee, 2018), las cepas específicas de *Aspergillus* son algunas de las fuentes más extendidas de medicamentos. En la naturaleza, los hongos de este género son los principales agentes de descomposición de diversas sustancias orgánicas (Park *et al.*, 2017). Las especies de *Aspergillus* producen un gran número de compuestos nuevos, incluidas las aflatoxinas, las napto- $\gamma$ -pironas, las ocratoxinas, el ácido ciclopiazónico, las fumonisinas, la patulina, la gliotoxina, el ácido kójico, las malforminas, la emodina, las bicoumarinas, el ácido nitropropiónico, el nitropropion, opiobolinas, entre otros, y muchas de estas sustancias exhiben propiedades biológicas interesantes (Siddiquee, 2018). Es importante resaltar el interés por el microorganismo *Aspergillus niger*, que al igual que otros hongos, tiene gran importancia industrial, lo que le permite utilizarse en la fermentación industrial, por su capacidad metabólica en hidrólisis de carbohidratos y la producción de ácidos orgánicos como es el ácido cítrico (Lu *et al.*, 2022). Por lo cual, *A. niger*, es un hongo filamentosos que, al estar presente en diferentes procesos industriales, los diferentes compuestos obtenidos por la cepa, lo hacen ser reconocido como seguro (GRAS), por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA)

(Schuster *et al.*, 2002; Putri *et al.*, 2020), involucrándose también su uso en el área agrícola (Galeano *et al.*, 2021).

### **Ácido Kójico**

El nombre 'ácido kójico' (KA) se derivó de "Koji" es un producto químico que se obtiene de varios tipos de hongos como *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. parasiticus*, y algunas especies de *Penicillium* (Saedi *et al.*, 2019). Entre ellos, *A. oryzae* es una especie bien conocida que produce ácido kójico como metabolito secundario (Park *et al.*, 2017; Sauer *et al.*, 2013). El ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona AK), es un metabolito secundario con diferentes características ácido débiles que le permiten tener diversas aplicaciones, inicialmente en la cosmética, después en productos alimenticios, medicina y farmacéuticos, y en la agricultura (Felipe *et al.*, 2023).

### **Síntesis de ácido kójico**

El AK es un metabolito secundario cuya vía de biosíntesis sigue sin estar clara hasta la fecha (Feng *et al.*, 2019; Perng-Kuang *et al.*, 2023), algunos autores como (Thines *et al.*, 2006), presentaron un esquema de vías metabólicas que conducen a los principales metabolitos secundarios. La principal fuente de energía de los organismos heterótrofos es la glucosa, la descomposición de la glucosa no solo da energía, sino que también proporciona los precursores necesarios para el metabolismo secundario. La degradación de glucosa a través del ciclo de las pentosas fosfato, así como la formación de triosas y pentosas, da como resultado una tetrosa (eritrosa-4 fosfato), que puede reaccionar con el fosfoenolpiruvato para producir ácido shikimico, que es la ruta por donde podría derivarse el ácido kójico. La triosa generada a través de glucólisis se convierte en piruvato y, posteriormente, en acetil-coenzima A, que es posiblemente el bloque de construcción más predominante en el metabolismo secundario de los hongos. Algunos autores mencionan que el ácido kójico se sintetiza a partir de la glucosa sin pasar por glucólisis (Arnstein y Bentley, 1953). Otros autores mencionan la participación de la glucosa deshidrogenasa y la glucanato deshidrogenasa en la biosíntesis de AK, que también implica enzimas o intermediarios involucrados en la biosíntesis, sin embargo, no han sido identificados del todo (Perng-Kuang *et al.*, 2023).



### Producción de Ácido Kójico

El KA es producido bajo diferentes procesos fermentativos, bajo algunos parámetros físicos como, agitación y aireación, estáticos, periodo de incubación, temperaturas optimas, y pH adecuado, las condiciones de cultivo es característico para cada microorganismo productor, además el medio de cultivo debe de contener, una fuente de nitrógeno, carbono, nutrientes minerales adecuados para la síntesis de KA (Rasmey y Abdel-Kareem, 2021; Chib *et al.*, 2023). Estudios se han centrado en la producción de ácido kójico por microorganismos como métodos alternativos no tóxicos y seguros, además, la producción de AK por fermentación aeróbica de especies de *Aspergillus* se considera una de las mejores técnicas utilizadas en las industrias (Ammar *et al.*, 2017). Algunos autores han implementado técnicas para mejorar la producción de ácido kójico, como lo mencionan, Feng *et al.*, 2019, quienes utilizaron el hongo *Aspergillus orizae*, denominado KA-11, mismo que se sometió a un programa combinado de mutagénesis, los resultados arrojaron que la producción de ácido kójico aumentó en un 47.0%, 87.1%, 126.2% y 292.3%, después de cada etapa de mutagénesis. Por otra parte, Ammar *et al.*, 2017, utilizaron dos cepas de *Aspergillus* de tipo salvaje, *A. flavus* (HAK1) y *A. orizae* (HAK2), para la biosíntesis de ácido kójico donde el medio de cultivo de sacarosa y extracto de malta (MES) fue el mejor medio de cultivo para la producción máxima de AK, además de que la producción máxima de AK, se ha estimado en un pH 4, después de siete días de incubación a 30°C, mientras que, la sobreproducción de KA se logró mediante mutagénesis de *A. flavus* HAK1 y *A. oryzae* HAK2 a través de su exposición a diferentes dosis de irradiación gamma, por lo que, las cepas mutantes (MT) *A. flavus* HAK1-M2 y *A. oryzae* HAK2-M26 fueron los mutantes más estables para la producción máxima de KA durante cuatro generaciones. En otra investigación, con la cepa *Aspergillus orizae* se inmovilizo en un biorreactor de soporte compuesto de plástico, donde aplicaron medio deficiente de nitrógeno para de esta manera aumentar la producción de AK en el biorreactor, evaluaron la eficiencia del cultivo inmovilizado para la producción de AK y el efecto de la morfología de *A. oryzae* en la producción de AK, después de tres ciclos de cultivo, se produjeron 83,47 g / L de AK en biorreactor (Liu *et al.*, 2016).

### Aplicaciones de ácido kójico en la industria

El ácido kójico es multifuncional, y sus derivados en medicina se basan en su biocompatibilidad, con propiedades antimicrobianas y antivirales, usado en la cosmética como, antimanchas, en la farmacéutica como, antiparasitarias, en la agricultura como, formulados de pesticidas e insecticidas, y en la industria alimentaria como, antioxidante y aditivo alimentario (Ammar *et al.*, 2017; Rodrigues, 2016; Saeedi *et al.*, 2019). (Shah *et al.*, 2017), aplicaron ácido kójico en frutos de litchi, para disminuir el pardeamiento, utilizaron tres dosis diferentes de AK, 2, 4 y 6 mmol L<sup>-1</sup> de AK en los frutos, y fueron almacenados a 5 ± 1 ° C con 90 ± 5% de humedad relativa durante 20 días. Los resultados mostraron que, la fruta tratada con 4 mmol L<sup>-1</sup> KA redujo la pérdida de peso y la descomposición de la fruta, mientras que 6 mmol L<sup>-1</sup> el AK retrasó el pardeamiento del pericarpio al mantener concentraciones de antocianina y fenólicas totales y actividad DPPH más altas, además la misma concentración aumento los sólidos solubles, acidez titulable y, las concentraciones de ácido ascórbico en fruto. Mientras que, (Yan *et al.*, 2020), evaluaron el efecto de la combinación de 25 mg L<sup>-1</sup> AK y 10 g L<sup>-1</sup> cloruro de calcio (AK+CaCl<sub>2</sub>) en la senescencia de postcosecha de brócoli, los resultados indicaron que el tratamiento con KA + CaCl<sub>2</sub> en los floretes de brócoli, inhibió el amarillamiento de los floretes y, en general, prolongó la vida útil, además disminuyó la tasa de respiración, la producción de etileno e inhibió la degradación de clorofila, la actividad enzimática APX, POD y CAT fueron elevadas, y la expresión de genes (*BoCHL1*, *BoCHL2*, *BoCHL3*, *BoPAO*, y *BoPPH*) involucrados en la degradación de la clorofila fueron regulados negativamente.

**ARTÍCULO**

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY ASPERGILLUS NIGER M4 WITH  
DIFFERENT CONCENTRATIONS OF YEAST EXTRACT AS NITROGEN SOURCE

Article

# Production of Kojic Acid by *Aspergillus niger* M4 with Different Concentrations of Yeast Extract as Nitrogen Source

Tomasa Quiterio-Gutiérrez<sup>1</sup>, Susana González-Morales<sup>2</sup>, José Antonio González Fuentes<sup>3</sup>, Adalberto Benavides-Mendoza<sup>3</sup>, Fabián Fernández-Luqueño<sup>4</sup>, Julia Medrano Macías<sup>3</sup> and Armando Robledo Olivo<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Protected Agriculture, Antonio Narro Autonomous Agrarian University. Saltillo, Coahuila. México; T.quiterio@hotmail.com

<sup>2</sup> CONACyT - Antonio Narro Autonomous Agrarian University. Saltillo, Coahuila. México; qfb\_sgm@hotmail.com

<sup>3</sup> Department of Horticulture, Antonio Narro Autonomous Agrarian University. Saltillo, Coahuila. México; jmedmac@gmail.com, jagf252001@gmail.com and abenmen@gmail.com

<sup>4</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; fabian.fernandez@cinvestav.edu.mx

<sup>5</sup> Fermentations and Biomolecules Lab., Food Science and Technology Department, Antonio Narro Autonomous Agrarian University. Saltillo, Coahuila. México; armando.robledo@outlook.com

\* Correspondence: [armando.robledo@outlook.com](mailto:armando.robledo@outlook.com), Tel.: +52 8444110209

**Abstract:** In agro-industrial processes are preferred, microorganisms that are not pathogenic and generate molecules generally recognized as safe (GRAS). The *Aspergillus niger* fungus has different industrial applications, being used to produce citric acid and other 166 secondary metabolites. The objective of this research was to optimize a culture medium to induce the production of kojic acid (KA) by the *Aspergillus niger* M4 strain in a liquid fermentation process. Four fermentative kinetics were developed in flasks, using different levels of yeast extract in 1) 0.05 g/L, 2) 0.10 g/L, 3) 2.5 g/L, 4) 2.5 g/L+Zinc sulfate. The culture medium conditions influenced the formation and speed of biomass and the synthesis and yield of KA. The optimum production points were from 72 h and 96 h with 0.552 g/L and 0.510 g/L of KA using 2.5 g/L of yeast extract and pH of 5.5. The *Aspergillus niger* M4 strain has the ability to produce kojic acid, induced by the concentration of the nitrogen source.

**Keywords:** kojic acid; *Aspergillus niger*; liquid fermentation; kinetic modeling.

---

## 1. Introduction

*Aspergillus* is a genus of ascomycete fungi of the *Aspergillaceae* family that contains a large number of species and is widely distributed in natural environments [1]. *Aspergillus niger* is a fungus of great industrial economic importance, due to its great adaptive metabolic capacity for carbohydrate hydrolysis and the production of organic acids and proteins, commercially producing citric acid [2, 3]. Around 166 secondary metabolites derived from *A. niger* have been detected, grouping into 5 types: pyranone ( $\alpha$ -pyrones,  $\gamma$ -pyrones, and naphtho- $\gamma$ -pyrones), alkaloid, cyclopentapeptide, polyketide and sterol [4, 5]. Within the  $\gamma$ -pyrones, there is kojic acid (KA), a metabolite of great industrial importance, due to its weak-acid characteristics that allow it to have several industrial

applications, such in the cosmetic, food, chemical, pharmaceutical, agriculture and medicine areas [6]. Some of the uses of KA in the food industry are as antioxidant, as preservative, as food additive to prevent enzymatic discoloration of vegetables, crabs, and shrimps, with antifungal effects [7, 8]. In cosmetics has been used as a skin lightening agent in cosmetic preparations [9, 10], being a copper chelator and inhibiting the activity of tyrosine containing copper ions at the active site, forming a KA-Cu-Tyrosine complex, which reduces enzyme activity in human cells by reducing melanin content [6, 8]. KA (5-hydroxy-2-hydroxymethyl- $\gamma$ -pyrone) is a secondary metabolite produced by a wide range of fungi of the genus *Aspergillus*, such as: *A. terreus* [11], *A. parasiticus*, *A. flavus* [12], and of the genus *Penicillium*, and certain bacteria [13]. A prominent strain is *Aspergillus oryzae* [14], called 'koji-kin' in Japanese, which is the origin of the common name of this organic acid [15]. A mutant of *A. niger* (FGSC A1279) has also been detected as a producer of KA [16]. The industrial importance of the *A. niger* strain lies in its adaptability to different carbon sources and culture medium conditions, allowing to find biomass waste-substrates for a low cost bioprocess. The metabolism of this micro-organism could be modified by changing the composition of the medium and the mode of fermentation [5], improving the production of secondary metabolites by optimizing the fermentation processes [11]. Different methods can be used, such as experimental designs, mathematical methods, and kinetic models for the optimization of fermentative processes [17]. Some of the conditions of the culture medium are pH, temperature, carbon, and nitrogen source, as well as incubation periods. For the production of KA, different sources of carbon (glucose, xylose, sucrose, starch, maltose, lactose, or fructose) and nitrogen ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ , yeast extract, or peptone) have been used with *Aspergillus flavus* strain [17]. Alternatively, when using inorganic sources of nitrogen, nitrate ions can inhibit enzymes involved in the KA biosynthesis by reducing their production [18]. While yeast extract (YE) as an organic source at concentrations between 1% and 5%, significantly increase synthesis and production of KA using *A. terreus* and *A. sojae* [11, 19]. High concentrations of the carbon source, and low availability of the nitrogen source, are key features to enhance KA production [20]. The unused carbon source which remains in the culture medium, can be converted to KA by the enzymatic activity that is found attached to the outer membrane of non-growing mycelial cells [20, 21]. This has given place to the favorable use of YE as an organic nitrogen source, compared to an inorganic source. On the other hand, Badar, *et al.* [22] evaluated the impact of pH variation on KA production, with two *Aspergillus* species, at pH: 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 and 8.5 producing: 8, 10, 6, 4 and 3 g/L KA, being better at pH: 4.5 with *A. flavus* at 20 days, while in *A. oryzae* with pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 and 8.5 the production was 5, 3, 2, 1.6, 1.1 and 0.5 g/L, being favored the pH: 3.5 (20 days). Promsang, *et al.* [23] mention that to produce KA with a different strain of *A. oryzae*, a pH between 3.0 and 5.5 is required. Other studies reported that during fermentation with *A. flavus* after 7 days of incubation at 30°C, reached a maximum production of KA using pH of 4.0 [24]. For the isolation of *A. flavus* and *A. oryzae* for KA production, the culture medium composition consisted in glucose, YE,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , with an initial pH of 3.0, and heat stress above 40°C [25]. Some authors have added  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in fermentative processes [23, 26], to act as a modulator of cellular amino acid metabolism and redox balance, exerting an antioxidant effect, inhibiting the presence of acetic acid [27]. Although some authors have previously proposed the use of  $\text{ZnCl}_2$ , for the production of KA with the *A. parasiticus* strain,  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations (10  $\mu\text{M}$ ) did not affect KA production [28]. Although culture media with the use of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  have already been made for the production of KA, the authors did not evaluate the influence of the nutrients, they only focused on the different sources of nitrogen. Derived from the above information, the hypothesis arises of

modifying the conditions of the culture medium during the liquid fermentation of the fungus *Aspergillus niger* M4, to generate an induction in the synthesis of KA. In the present investigation, the *A. niger* M4 strain was subjected to liquid fermentation, using diverse levels of yeast extract as a nitrogen source, addition of zinc sulfate as a nutrient, and pH adjustments of the medium under different times for the kojic acid obtention.

## 2. Materials and Methods

### *Microorganism*

In the present study, the *Aspergillus niger* M4 (code KY825168.1) strain was used (Property of the Fermentations and Biomolecules Laboratory, of the Food Science and Technology Department, at the Antonio Narro Autonomous Agrarian University). The strain was kept in preservation at -20°C, in a medium containing skim milk 10% w/v and glycerol 5% w/v. The reactivation of the fungus was through Petri dishes, which contained potato dextrose agar (PDA, Bioxon México), incubating for 7 days at 30°C. For the preparation of the inoculum, the spores were collected using a sterilized solution of Tween 80 (Hycel, Mexico) at 1%, and the spores were counted in a Neubauer chamber.

### *Fermentation conditions*

For the fermentation kinetics, a basic medium composed of 100 g/L of glucose as carbon source, 1 g/L of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 0.5 g/L of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was used. Diverse levels of yeast extract (YE) were used as a nitrogen source, which were: 0.05 g/L, 0.10 g/L and 2.5 g/L, and an additional medium containing 2.5 g/L of YE + 0.1 g/L of  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (YE+Zn). The pH of the initial medium was 5.5 for each media with YE variations. The fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks, and 20 mL of medium was added with an inoculation of  $1 \times 10^6$  spores per mL of *A. niger* M4. The flasks were incubated at 30°C and kept shaking at 125 RPM (INNOVA 44 Orbital Incubator), taking samples at various times for the analytical determinations. For each YE level, a completely randomized design was developed, where each flask was considered as an experimental sample reactor, and intervals of 24 h were considered as experimental time conducted by triplicate, for a total of 78 reactors at times of up to 552 h. The complementary pH test for 3.5 and 5.5 pH values was carried out in the same manner described above, placing 36 reactors at a time of 120 h, monitoring each 24 h. The pH evaluation was realized due it has been reported that the pH of the medium determines the growth rate and fermentation processes of KA producing microorganisms [24]. For subsequent analyses, the liquid content of the flasks after filtration was used, considering it as raw fermentation extract (RFE).

### *Analytical determinations*

To obtain the biomass, each reactor was taken at its respective fermentation time, obtaining the RFE by double filtration (Whatman N°42), using a Kitasato flask and a vacuum pump. The mycelium obtained in the first filter was dried in an oven and kept for 24 h at 80°C, to determine the biomass by weight difference. The filtered RFE was stored at -20°C for further analysis. All samples were analyzed in triplicate and the averages obtained were reported.

The glucose content was quantified by the Miller method [29] placing 1 mL of RFE in a glass tube, and 1 mL of DNS reagent. The tubes were boiled in a water bath for 5 minutes, then the reaction was stopped with an ice bath for 5 minutes. 5 mL of distilled water were added, shaken, and left to stand for 5 minutes at room temperature, then read in a UV-Vis

spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). A calibration curve was made with dextrose (Jalmek) at 1000 mg/L.

KA quantification was performed using both, the spectrophotometric technique and HPLC (high performance liquid chromatography). For spectrophotometer quantification, the method described by Bentley [30] was used, which consisted of adding 1 mL of previously filtered RFE, 2 mL of 1% FeCl<sub>3</sub> prepared with HCl (0.1 N), diluting with 5 mL of distilled water. Readings were made at 505 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). The calibration curve was prepared using standard grade Kojic Acid (Sigma-Aldrich) at 1000 mg/L. The data analyzed were expressed in grams of KA per liter of fermentation (g/L).

To determine the KA content by HPLC the method described by Promsang, *et al.* [23] was used, with some modifications. The RFE obtained was filtered again through 13 mm nylon membranes with a 0.45 µm pore. The filtered samples were degassed before being injected into the high performance liquid chromatography (HPLC) equipment. To analyze kojic acid, a Luna C18(2) separation column (5 µm; 150 x 4.6 mm) and a UV Detector at 270 nm were used. The mobile phase consisted of: A) 94.9% HPLC grade water, 5% acetonitrile, and 0.1% formic acid; for mobile phase B) 94.9% acetonitrile, 5% HPLC grade water, and 0.1% formic acid. The proportion of solvents A:B was 40:60 with a flow rate of 1 mL/min, and a temperature of 22°C. The injection volume was 100 µL, with a retention time of 12 minutes per sample. The calibration curve was performed with HPLC grade KA at 75 mg/mL.

To measure the antioxidant capacity in the fermentations with different pH, two radical scavenging methods DPPH and ABTS, were used. For the first method, the one described by Brand-Williams, *et al.* [31], with some modifications, was used. A 0.1 mM mixture of radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazin-1-yl) was prepared, diluting with 80% methanol. The absorbance of the solution was adjusted to 0.700 ± 0.02 at 520 nm, using a fully automatic microplate reader (BIOBASE-EL 10A, Jinan, SHG, China). For microplate quantification, 6 µL of RFE and 234 µL of DPPH (0.1 mM) were added to each well, allowed to settle for 30 minutes, and then reading was performed at 520 nm.

For the second type of measurement (ABTS), it was analyzed by the spectrophotometric method of Re, *et al.* [32], with some modifications. The ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical was prepared at 7 mM with 2.45 mM potassium persulfate at a concentration (1:1 v/v). Mixture was settled down for 16 hours at 30°C. The absorbance of the solution was adjusted with 20% ethanol to 0.700 ± 0.02 at 750 nm, using a fully automatic microplate reader (BIOBASE-EL 10A, Jinan, SHG, China). For quantification, 5 µL of RFE and 240 µL of ABTS were added in microplate wells, with a stabilization time of 6 minutes before read at 750 nm. Both radical capture methods were expressed as percentage inhibition, using the following formula:

$$\text{Inhibition [\%]} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Where  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the sample, and  $A_{\text{control}}$  is the blank absorbance for the ABTS with ethanol 20%.

*Calculations of parameters associated with the fermentative process.*

The Verhulst logistic growth model, Pirt model, and Luedeking-Piret model, were used to estimate the theoretical values of the biomass, substrate, and product coefficients, respectively, as described by Robledo, *et al.* [33].

The growth rate of the microorganism was measured by estimating the number of cells ( $X$ ) over time ( $t$ ), considering the carrying capacity of the system ( $X_{max}$ ) and the maximum rate of cell growth ( $\mu_{max}$ ).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot X \left( \frac{X_{max} - X}{X_{max}} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

with the solved form

$$X(t) = \frac{X_{max} X_0}{(X_{max} - X_0) e^{-\mu_{max} t} + X_0} \quad \text{Eq. 3}$$

Where  $X_0$  are the cells present in the medium when  $t = 0$ . For values of  $\mu_{max} > 0$ , the resulting growth curve will have a sigmoidal shape and will be asymptotic to the carrying capacity ( $X_{max}$ ). The higher  $\mu_{max}$  is, the faster the curve will reach the load capacity ( $X_{max}$ ) in time.

For the production of biomass, it is required to consume substrate ( $S$ ) for the synthesis of new cells ( $S_G$ ), and substrate to maintain existing cells ( $S_M$ ). Substrate consumption will always be related to time, and to the biomass in the culture medium, and can be represented by the expression:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} + m \cdot X \quad \text{Eq. 4}$$

Where  $m$  is the cell maintenance coefficient,  $Y_{X/S}$  is the maximum growth yield coefficient, when  $\Delta S_M = 0$ .

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{(S_1 - S_2)_G + (S_1 - S_2)_M} \quad \text{Eq. 5}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{(S_1 - S_2)_G} \quad \text{Eq. 6}$$

where  $X_1$  is the biomass initial condition and  $X_2$  is the biomass maximum value;  $S_1$  is the substrate initial condition and  $S_2$  is the substrate concentration maximum value. Solution of Equation 4 can be obtained as a function of  $X$  as follows:

$$S(t) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{X/S}} - \frac{m \cdot X_{max}}{\mu_{max}} \cdot \ln \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right] \quad \text{Eq. 7}$$

where  $S_0$  is the initial condition for substrate level,  $S$ .

Kinetics of product ( $P$ ) formation was modeled using the equation as follows:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \cdot \frac{dX}{dt} + k \cdot X \quad \text{Eq. 8}$$



where  $Y_{P/X}$  is the product yield in terms of biomass (units of product per unit of biomass) and  $k$  is the secondary coefficient of product formation or destruction.

$$Y_{P/X} = \frac{P_2 - P_1}{X_1 - X_2} \quad \text{Eq. 9}$$

where  $P_1$  is the product initial concentration and  $P_2$  is the maximum product concentration;  $X_1$  is the biomass initial condition and  $X_2$  is the biomass concentration at the product maximum value. It is possible to solve Equation 8 as a function of biomass.

$$P_{(t)} = P_0 + Y_{P/X} \cdot (X - X_0) + \frac{k \cdot X_{max}}{\mu_{max}} \cdot \ln \left[ \frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right] \quad \text{Eq. 10}$$

Substrate consumption ( $q_s$ ) and product formation ( $q_p$ ) rates will be linked to transformation yields and growth rate.

$$q_p = \mu_{max} \cdot Y_{P/X} \quad \text{Eq. 11}$$

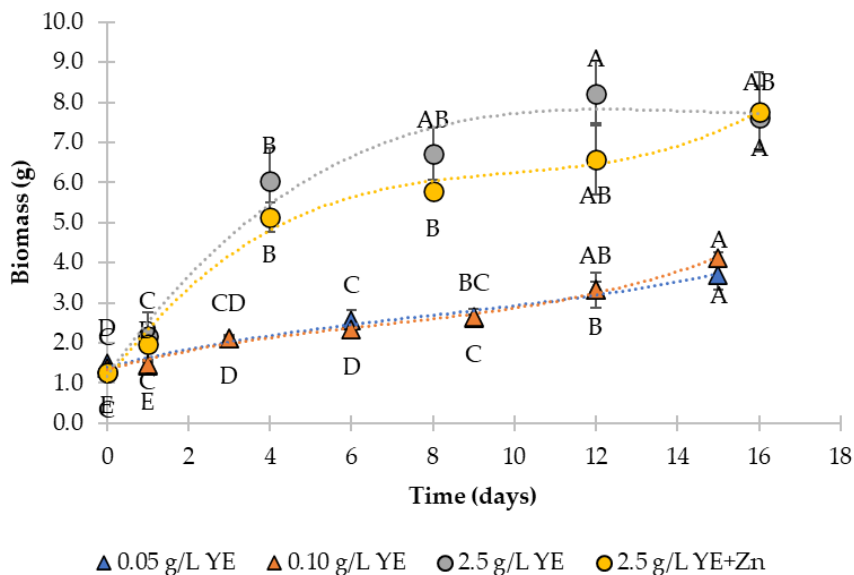
$$q_s = \frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} + m \quad \text{Eq. 12}$$

#### *Statistical analysis*

The results were represented as the mean of the data  $\pm$  standard deviation, performed from three replicates per sample. The data were processed with the statistical software Minitab (version 17.1.0). All data presented a normal distribution and an analysis of variance (ANOVA), and a Tukey comparison test of means ( $p < 0.05$ ) were performed. For all the adjustments of the experimental data to the models, the Excel Solver tool was used, seeking to minimize the squared errors between the experimental values and the model. As confidence indicators of the models, the mean square error ( $MSE$ ) and the  $R^2$  values were used.

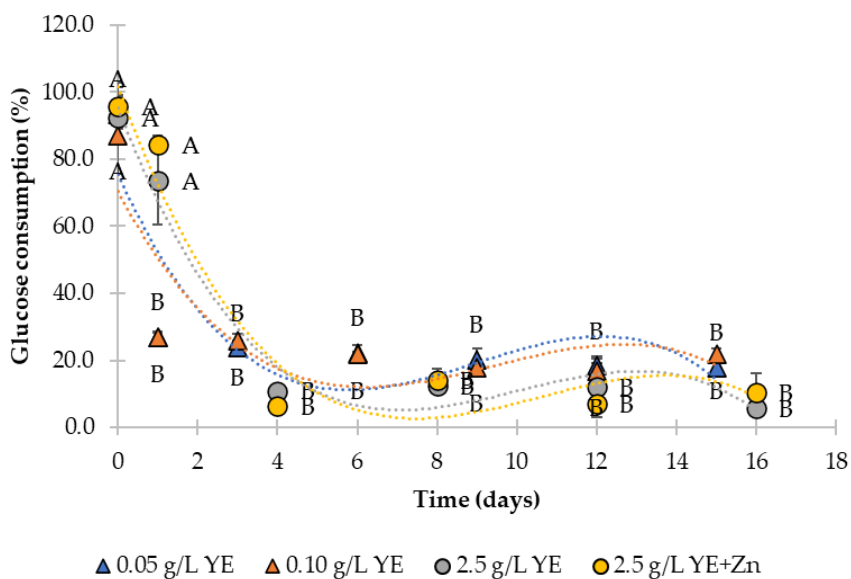
### **3. Results**

The adaptability of *A. niger* for the production of industrial metabolites, is based on its growth environment. The components present in the fermentative medium that go from the concentration in the source of nitrogen, carbon, and minerals will have an influence on the production of KA [24]. Four different media were evaluated in the production of KA, in response to the formation of biomass, reduction of sugars, and the production of KA were evaluated. The biomass formation of the different kojic acid production is shown in Figure 1. The concentrations of 0.05 g/L and 0.10 g/L of YE present an exponential phase between the first and third day, increasing from 1.44 g X/g glucose to 2.11 g X/g glucose for 0.05 g/L of YE, meanwhile, for 0.10 g/L of YE the first and third day values were 1.47 g X/g glucose and 2.12 g X/g glucose. In the addition of 2.5 g/L of YE, they increased from 2.18 g X/g glucose to 6.04 g X/g glucose between the first and fourth day. For the conditions with 2.5 g/L of YE+Zn the increment was from 1.26 g X/g glucose to 5.13 g X/g glucose in the same lapse of 4 days. After the 4th day of fermentation for the 4 conditions evaluated, it could be indicated that the growth process reached its stationary phase. The maximum growth occurred after 12 days of fermentation under the conditions of 2.5 g/L of YE, increasing the biomass 6.4 times more compared to zero time.



**Figure 1.** Biomass formation of *Aspergillus niger* M4 using different concentrations of yeast extract as the only nitrogen source. The dotted lines represent a polynomial trend line of 3<sup>rd</sup> order. Different uppercase letters indicate statistically significant differences between same concentration of yeast extract (Tukey  $p < 0.05$ ).

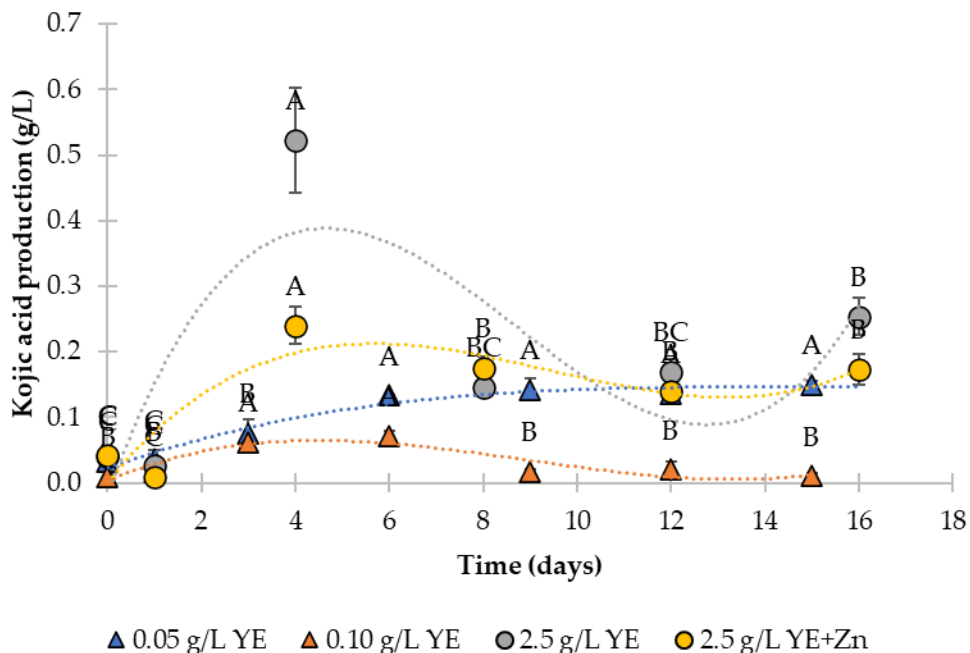
Sugars, such as glucose, are essential for the production of secondary metabolites [34]. The glucose content is shown in Figure 2. During the fermentation of 0.05 g/L and 0.10 g/L of YE, in the first hours glucose it was reduced by 66% and 60%, respectively. While for 2.5 g/L of YE and 2.5 g/L of YE+Zn decreased by 19% and 12%, respectively, for the same period of time. The highest glucose consumption of 89.4% was reached with 2.5 g/L of YE+Zn, on the 12<sup>th</sup> day of fermentation.



**Figure 2.** Glucose consumption by *Aspergillus niger* M4 using different concentrations of yeast extract as sole nitrogen source. The dotted lines represent a polynomial trend line of 3<sup>rd</sup> order.

Different uppercase letters indicate statistically significant differences between same concentration of yeast extract (Tukey  $p < 0.05$ ).

The production of the *Aspergillus niger* M4 fungus to synthesize kojic acid is shown in Figure 3. KA production starts from the 3<sup>rd</sup> day of fermentation for all YE concentrations evaluated. For the concentration of 0.05 g/L of YE, a maximum yield of 0.150 g KA/L was obtained, after 15 days. On the other hand, the concentration of 0.1 g/L of YE, had a maximum yield of 0.071 g KA/L, after 6 days of fermentation. For the concentrations of 2.5 g/L of YE and 2.5 g/L of YE+Zn, maximum yields of 0.523 g KA/L and 0.240 g KA/L were obtained, respectively, both at 4 days of fermentation.



**Figure 3.** Kojic acid production in liquid medium by *Aspergillus niger* M4 using different concentrations of yeast extract as the only nitrogen source. The dotted lines represent a polynomial trend line of 3<sup>rd</sup> order. Different uppercase letters indicate statistically significant differences between same concentration of yeast extract (Tukey  $p < 0.05$ ).

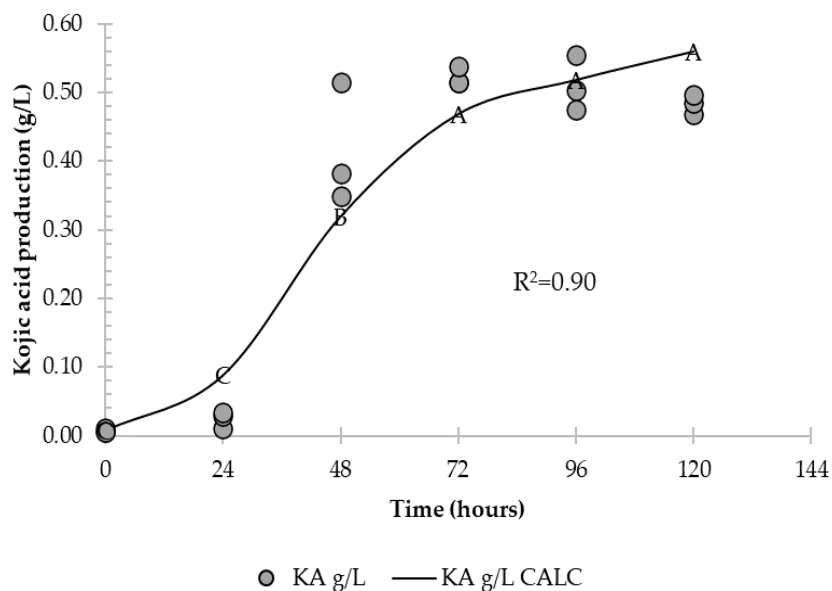
Table 1 was generated with the kinetic parameters from the evaluations with all the concentrations of yeast extracts. The highest parameters of maximum growth velocity ( $\mu_{max}$ ), biomass-substrate yield ( $Y_{X/S}$ ), product-to-biomass yield ( $Y_{P/X}$ ), substrate consumption rate ( $q_s$ ), and product formation rate ( $q_p$ ), were presented for the concentration of 2.5 g/L YE. The values of  $Y_{P/X}$  and  $q_p$  for 0.05 g/L YE, and  $q_p$  for 0.10 g/L YE, presented insignificant values in ranges of  $10^{-7}$ - $10^{-9}$ . For none of the YE concentrations, maintenance coefficient values ( $m$ ) or product formation ( $k$ ) were shown.

Table 1. Kinetic parameters of fermentation using different concentrations of yeast extract as the only nitrogen source. The values were calculated from the respective models mentioned above.

Parameter	0.05 g/L YE	0.10 g/L YE	2.5 g/L YE	2.5 g/L YE+Zn
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.006±0.001 c	0.004±0.001 c	0.035±0.001 a	0.024±0.002 b
$Y_{XS}$ (g X/g S)	0.019±0.001 c	0.020±0.003 c	0.082±0.001 a	0.052±0.004 b
$m$ (g X/g S h)	0.000±0 b	0.000±0 b	0.000±0 a	0.000±0 b
$Y_{PX}$ (g KA/g X)	0.000±0 b	0.007±0.006 b	0.032±0.004 a	0.029±0.001 a
$k$ (g KA/g X h)	0.000±0 a	0.000±0 a	0.000±0 a	0.000±0 a
$q_S$ (g glu/g X h)	0.296±0.062 ab	0.199±0.051 b	0.430±0.001 ab	0.460±0.084 a
$q_P$ (g KA/g X h)	0.0000±0 c	0.0000±0 c	0.0011±0.0001 a	0.0007±0.0001 b

Values are presented as mean (± standard deviation,  $n = 3$ ). Different lowercase letters in the same row indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

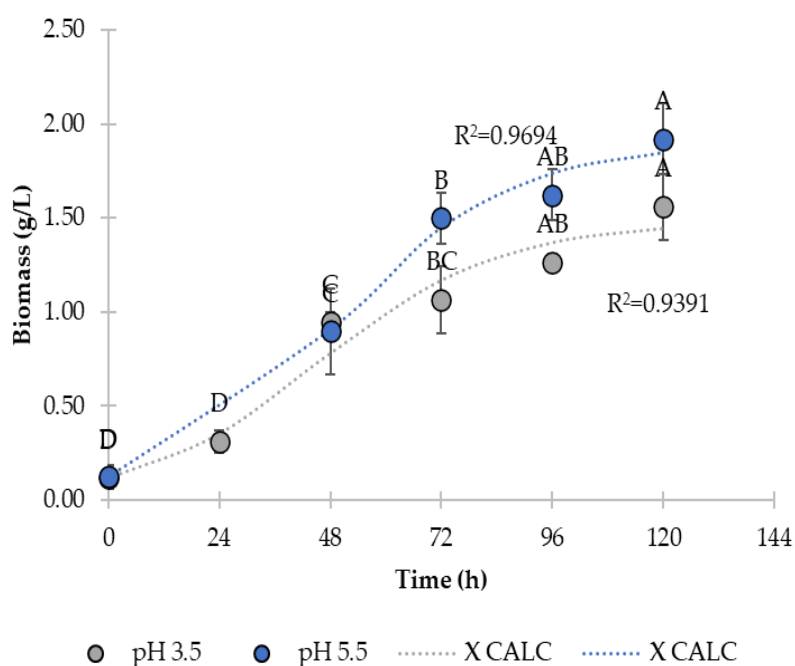
For the standardization of the induction of KA, a kinetic of 120 h was submitted with the use of 2.5 g/L of YE as a nitrogen source (Fig. 4). The optimal points of production was at 72 h and 96 h with 0.522 g/L and 0.510 g/L of KA. The results of this study showed that, in terms of general production, fermentation with 2.5 g/L of yeast extract in the culture medium were favorable for KA production, and that even fermentation times were shorter, favoring the obtaining of the metabolite under the aforementioned conditions.



**Figure 4.** Production of kojic acid by *Aspergillus niger* M4 in liquid medium fermentation, at 120 h using 2.5 g/L of YE as the only nitrogen source. The solid line represents the calculated values by the Equation 10 [ $R^2 = 0.9473$ ;  $MSE = 0.0083$ ]. Different uppercase letters indicate statistically significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

### Effect of pH on kinetic parameters

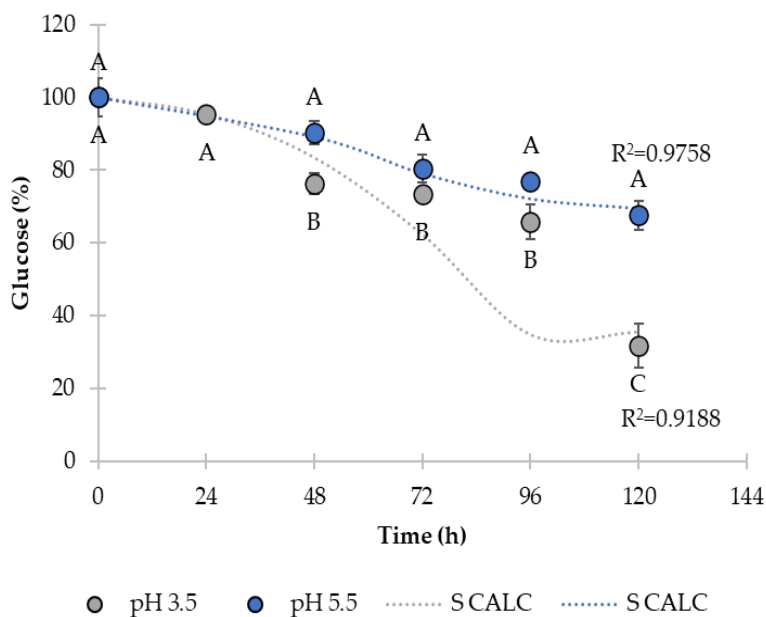
To investigate the variability of KA production when using the conditioned culture medium, the effect of the pH of the growth medium was evaluated, being at pH 3.5 and pH 5.5 in a time of 120h. The biomass growth kinetics process for 120 h is shown in Figure 5. In the 72 h with a pH 3.5 there is an increase in biomass of 1.067 g/L, while with pH 5.5 in the 72 h and 96 h the increase is 1.500 g/L and 1.622 g/L. The experimental data were adjusted to the equation 3. The pH 5.5 was more favorable during the biomass growth phase, therefore, the addition of acid to adjust the pH to 3.5 of the culture medium could not be effective for the fungal activity, affecting the production of KA.



**Figure 5.** Biomass formation at 120 h using 2.5 g/L of yeast extract as nitrogen source. The dotted line represents the calculated values by the Equation 3 [pH3.5:  $R^2 = 0.9391$ ;  $MSE = 0.0168$ ; pH 5.5:  $R^2 = 0.9694$ ;  $MSE = 0.0138$ ]. Different uppercase letters indicate statistically significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

### Substrate

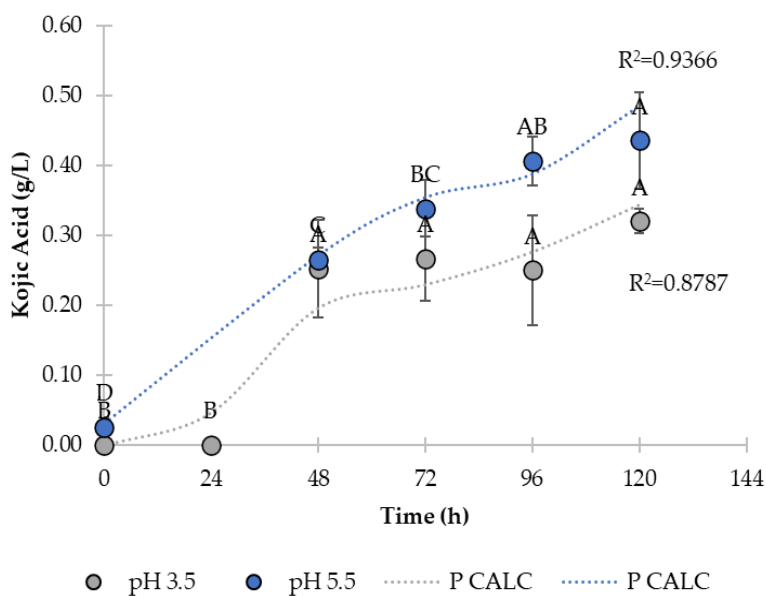
The consumption of glucose as reducing sugar is observed in the Figure 6. In conditions of pH 3.5 the decrease occurred after 48 h, while in pH 5.5 the decrease was after 72h. Maximum glucose consumption was 68.2% at pH 3.5 and 32.3% at pH 5.5, both at 120 h of fermentation process. The glucose present in the culture medium was mostly accumulated under conditions of pH 5.5, while with a pH 3.5 influenced the reduction of sugars, however, the pH adjustment interfered in the production of KA (Figure 6).



**Figure 6.** Substrate at 120 h using 2.5 g/L yeast extract as nitrogen source. The dotted line represents the calculated values by the Equation 7 [pH 3.5:  $R^2 = 0.9188$ ;  $MSE = 11.1924$ ; pH 5.5:  $R^2 = 0.9758$ ;  $MSE = 1.9768$ ]. Different uppercase letters indicate statistically significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

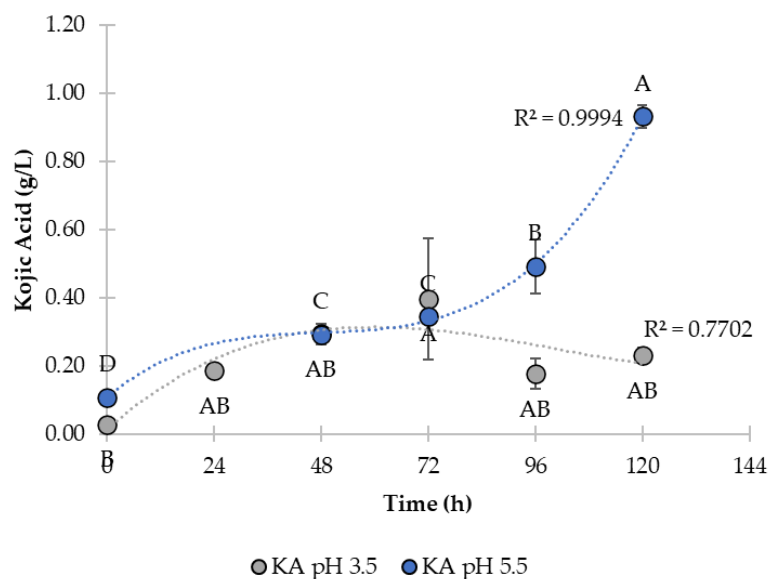
#### Product

In the product formation (Figure 7) at a pH 3.5 the presence of KA was obtained in 48 h, producing 0.252 g/L, and kept values near until the end of the process. On the other hand, with pH 5.5 the product was generated at the same 48 h with a production of 0.265 g/L, with an increased tendency until the end of the process, reaching the maximum value of 0.436 g/L.



**Figure 7.** Production of KA during 120 h using 2.5 g/L yeast extract as nitrogen source. The dotted line represents the calculated values by the Equation 10 [pH 3.5:  $R^2 = 0.8787$ ;  $MSE = 0.0022$ ; pH 5.5:  $R^2 = 0.9366$ ;  $MSE = 0.0025$ ]. Different uppercase letters indicate statistically significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

The RFE measured by HPLC are found in Figure 8. It is observed that at pH 3.5 a value of 0.396 g/L of KA are produced at 72 h, however, KA production decreased during the remaining fermentation time at 96 h and 120 h. At pH 5.5 after 96 h a production of 0.491 g/L of KA is above the highest value obtained with pH 3.5, and the highest value obtained with pH 5.5 was of 0.931 g/L of KA at 120 h. It could be considered that the conditions to produce KA by means of *Aspergillus niger*, the pH of the initial medium should be pH 5.5, since there could be the possibility that by adjusting pH 3.5 the medium is too acidic for the fungus.



**Figure 8.** Kojic acid measurement by HPLC during 120 h of fermentation using 2.5 g/L yeast extract as nitrogen source. Dotted lines are the order 3<sup>rd</sup> polynomic tendency line [pH 3.5:  $y = 2E^{-06}x^3 - 0.0002x^2 + 0.011x + 0.10733$ ; pH 5.5:  $y = 2E^{-06}x^3 - 0.0002x^2 + 0.011x + 0.1071$ ]. Different uppercase letters indicate statistically significant differences (Tukey  $p < 0.05$ ).

All modeled parameters are summarized in table 2, where it can be observed that pH 5.5 medium conditions favored the biomass production and yielded better KA production. The outstanding results are the growth speed ( $\mu_{max}$ ), being the pH 5.5 process the fastest to favor fungal growth, and the biomass product yield ( $Y_{P/X}$ ), where the process at pH 5.5 presents the highest number of grams of KA per gram of glucose.

Table 2. Kinetic parameters of fermentation using two values of pH in the culture medium and only 2.5 g/L of yeast extract as the only nitrogen source. The values were calculated from the respective models mentioned above.

Parameters (units)	pH 3.5	pH 5.5
$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	0.049±0.001	0.065±0.004
$Y_{XS}$ (g X/g S)	0.345±0.010	0.173±0.068
$m$ (g X/g S h)	0.135±0.015*	0.108±0.016*
$Y_{PX}$ (g KA/g X)	0.231±0.005	0.246±0.005
$k$ (g KA/g X h)	0	0
$q_S$ (g glucose/g X $h^{-1}$ )	0.276±0.017	0.347±0.005
$q_P$ (g KA/g X $h^{-1}$ )	0.015±0.003*	0.016±0.001*

Values are presented as mean ( $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ). Asterisk in the same row indicate NO statistically significant differences ( $p < 0.05$ )

#### *Antioxidant capacity by DPPH and ABTS*

Assays based on electron transfer, measure the ability of an antioxidant to reduce an oxidant, which is represented by the color change that occurs when it is reduced, and correlates with the antioxidant concentration in the sample (ABTS or DPPH). Although the reducing capacity of a sample is not directly related to its radical scavenging capacity, it is still an important parameter of antioxidants [35]. On the other hand, the inhibition percentage of both assays (ABTS and DPPH) is expressed using effective concentration values ( $EC_{50}$ ), which is reported as the amount of antioxidants necessary to reduce the initial concentration of sequestering radicals by 50% [36]. When measuring the antioxidant capacity DPPH and ABTS, all values were below the  $EC_{50}$  (Table 3). However, the highest values were reached when the KA accumulation was the higher one. From the point of analysis, the purification of the KA metabolite could be carried out to avoid interferences in the analysis of the antioxidant capacity.

Table 3. Percentage inhibition of DPPH and ABTS in two fermentation processes at pH3.5 and pH 5.5.

Time (h)	pH 3.5		pH 5.5	
	DPPH (% inhibition)	ABTS (% inhibition)	DPPH (% inhibition)	ABTS (% inhibition)
0	1.89±1.32b	0.062±0.91b	8.42±1.07c	12.88±1.25b
24	15.64±0.95a	9.92±1.03a	nd	nd
48	17.25±1.38a	14.36±3.99a	14.37±0.82b	18.04±2.54a
72	16.37±2.64a	13.71±1.84a	17.12±7.41ab	15.45±1.18ab
96	18.44±0.27a	11.68±3.96a	16.59±6.11ab	16.18±0.99a
120	18.41±0.51a	14.48±2.28a	18.73±4.93a	17.56±1.53a
CV	8.76	23.98	12.64	9.96

Values are presented as mean ( $\pm$  standard deviation,  $n = 3$ ), different lower case letters in the same column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ )



#### 4. Discussion

Endophytic fungi are recognized as a source of bioactive secondary metabolites with various potential applications in medicine, agriculture, and the pharmaceutical industry [37]. Fermentative processes use fungi to convert substrates into different products [38]. Kojic acid is an important biomolecule produced by fermentative biological processes [39]. Some organic nitrogen sources, like peptone and yeast extract, act as precursors in the production of kojic acid [40], as well as some inorganic sources [11, 41]. The growth medium and the conditions for the production of metabolites influence the formation of biomass, the carbon source consumption, and the synthesis of KA. Kojic acid is commonly produced mainly by species such as *A. oryzae* and *A. flavus* [30], whose studies are currently more based on molecular modulation [42]. Other *Aspergillus* species, such as *A. tamarii* and *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. sojae*, and some of the *Penicillium* genus [6], whose secondary metabolite has multiple applications, initially in cosmetics, and later in food, medicine, pharmaceutical products, and in agriculture [34]. The KA is produced under different fermentative processes, under some physical parameters such as agitation and aeration, static, incubation period, optimal temperatures, and adequate pH. The culture conditions are characteristic for each producing microorganism, in addition the culture medium must be contain, a source of nitrogen, carbon, mineral nutrients suitable for KA synthesis [19, 31-33, 43].

In the present investigation, seven fermentative processes using an *Aspergillus niger* strain were developed, with different levels of yeast extract as organic nitrogen source, and two pH levels. The production of KA can be obtained by modifying the culture conditions, the carbon and nitrogen source, the incubation temperature, and the pH of the medium [44]. When using 0.05 g/L of yeast extract the formation of biomass started at 72 h increasing gradually until 360 h, by the other hand, the reducing sugars followed an inverse trend from biomass, they went decreasing during time. Some investigations report the fungal growth of *Aspergillus sojae* started after 24 h and a maximum at 96 h, with a dry weight of 3.67 g/L, and the kojic acid production was achieved 24 h after the cell growth reached the stationary phase [19]. In another study, the production of KA and the fungal biomass of *Aspergillus oryzae* increased as the fermentation progressed, reaching the maximum biomass value at day 12<sup>th</sup> and reducing glucose up to 42% coinciding with the production [41]. Saraphanchotiwitthaya and Sripalakit [45] mentioned that there is a consumption of more than 90% glucose at 12 days by *Aspergillus oryzae* strain, and KA production begins to increase from day 6.

Regarding our study, the use of 0.10 g/L of YE follows the same formation of biomass and sugars consumption as mentioned by Saraphanchotiwitthaya and Sripalakit [45], however, the KA production showed a peak on day 6 (144 h) and subsequently there is a decrease in the metabolite. It is mentioned that when there are high concentrations of YE, more than 90% of the glucose is consumed for cell development during the growth phase, leaving less than 10% for the conversion of KA during the production phase [17] being a possible reason for a lower KA production. The decrease of KA after day 6 could be due an accumulation of other organic acids or unknown substances that could inhibit the production of KA [17]. According to other investigations, the decrease in the KA value can be generated by different factors, ranging from concentrations in nitrogen sources, carbon, temperature, pH, the incubation period, among others [43]. Each one of these factors will be different for each producer microorganism, even with the *A. oryzae* producer strain itself, where production times can be extended up to 20 days with temperatures of 40°C,

generating amounts of KA of 0.2 g/L [22], when its production has been reported up to 42 g/L [46]. Other authors have reported favorable productions in ranges of 25°C-30°C [47]. For example, Rasmey and Abdel-Kareem [43] reports that with temperature peaks above 30°C, there is a decrease in KA from 68 g/L to 0.5 g/L of KA with *A. oryzae*, and above temperatures of 45 °C production reached 0 g/L.

The fermentation process with 2.5 g/L of YE showed the best yields for biomass production, and KA synthesis, being the 96 h the point for optimum values. The same behavior of the KA values was showed in the 2.5 g/L of YE+Zn fermentation, but in less amounts compared with the 2.5 g/L of YE. This effect could be because the ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O did not act as a modulator of cellular amino acid metabolism and redox balance, reducing the antioxidant effect and promoting the presence of acetic acid [27]. Variation of the YE and glucose levels can maximize the KA production, in addition, there is an interaction between YE, glucose, and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in conjunction [11], that could represent a significant effect in the KA production. It has been reported that the concentrations of phosphorus (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in the culture medium for the production of KA could generate variability in productivity. By increasing concentrations of phosphorus (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> to 1.5 g/L) in a medium with glucose, the production of KA was affected [43], while other authors mention that 10.3 mM of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> presents a considerable interaction between glucose and phosphate, with its optimal level of yeast extract [11]. This comparison was made in order to understand that with the addition of ZnSO<sub>4</sub> there was productivity, but it was lower, and that the use of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> did not interfere with only the use of 2.5 g/L of YE. There are several ways to add zinc to the culture medium but adding Zn<sup>2+</sup> (10 µM) during fermentation did not affect KA synthesis, however, when salts such as NaCl are added to the culture medium, it does inhibit production. from KA [28]. It could give us an indication that the salts provided by ZnSO<sub>4</sub> decreased production but did not inhibit it. In studies performed by Ariff, *et al.* [48] with the *Aspergillus flavus* strain, the maximum concentration of KA achieved was at the end of the fermentation in 564 h, with a yield of 0.325 g KA/g glucose, and a total production of 0.0576 g KA/L·h. The production of KA is improved with the use of 2.5 g/L of YE, in a smaller scale in the fermentative time. With other producing strains, such as *A. terreus*, properly mentioned by Shakibaie, *et al.* [11], the use of 1 g/L of yeast extract produces a maximum of KA (2.21 g/L), and concentrations of 5 g/L also induce the production of KA with the *A. flavus* strain, with a production of 25.8 g/L [49], although it is not comparable with the production by *A. niger*, the conditioning of the source of nitrogen was appropriated to achieve production.

As the KA production times in the YE screening fermentation were below the 144 h, the standardized conditions were implemented until 120 h with 2.5 g/L of YE as the best result. In the first 24 h the biomass increased until 120 h, while the greatest sugars consumption was between 72 h and 96 h, as the same for the KA production. With this standardization, fermentation times are shortened optimizing production. El-Kady, *et al.* [50], optimized the nutritional conditions for the *Aspergillus flavus* strain, to maximize the production of KA using 100 g/L of glucose, 5 g/L of YE, 1.5 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, as sources of carbon, nitrogen, and phosphorus, respectively. The production of KA varies from 7 to 10 days depending on the type of producing strain, such as *A. fumigatus* (0.37 g KA/L), *A. ustus* (0.29 g KA/L), *A. flavus* (0.28 g/L), *A. terreus* (2.21 g/L) [11]. Also *Aspergillus* spp., metabolic synthesis depends on the growth medium, and the incubation conditions, these both having a strong influence on the production of KA [24]. Among above mentioned compounds, the principal compound that affect the induction or repression of the KA production is the YE. In fermentations with 5 g/L of YE, an increase in the concentration

of KA can be obtained, however, at concentrations of 10 g/L of YE the KA production is lower [17].

Respect with the equations mentioned above, all YE levels evaluated permitted to obtain important kinetic parameters that facilitate to choose the best KA production process. Both, 2.5 g/L YE and 2.5 YE+Zn treatments, were the best conditions to get a maximum grow rate, provably due to the YE concentration (higher than other two treatments), that permits the usage of nitrogen molecular forms to perform cell formation during the fermentation process. The best product-biomass yield, also was achieved with 2.5 g/L YE and 2.5 YE+Zn treatments, showing that the biomass production and growth rate is linked to the KA synthesis, and the concentration of YE induced the metabolite production. The use of ZnCl<sub>2</sub> does not affect micellar growth for the *A. parasiticus* strain, presenting a point of KA production at 72 h (10.5 mmol KA/g dry weight), demonstrating that there are no negative effects with the use of ZnCl<sub>2</sub>, however, under the presence of salts such as NaCl, there is an inhibition in the production of KA [28].

The biomass did not present any variation with the addition of zinc; however, the KA production was lower when adding the zinc source. Probably the presence of this molecule in its sulfated form could generate an inhibition, decreasing the synthesis yield.

The biomass-product yield was considered to determine if *Aspergillus niger* M4, is a strain that can be used for the synthesis and production of KA. The medium used was adjusted to pH 3.5 and pH 5.5 following the better conditions obtained in previous experiments (120 h using 2.5 g/L of YE). To describe the fermentation behavior for KA production by *Aspergillus* spp., at various pH levels, the proposed models based on logistic and Luedeking-Piret equations, were considered adequate [49]. In this research work, the biomass (fungal growth), substrate (reducing sugars), and product (kojic acid production) parameters, were considered for the simulation of KA production during fermentation process. Ariff, *et al.* [48], suggests that the proposed models based on logistic equations are sufficient to describe fungal growth, glucose consumption and kojic acid production. With respect the fermentation process with medium pH 3.5 and pH 5.5, it was found that with pH 3.5 the production had a negative impact, being at 72 h the optimal point of KA production, subsequently affecting the concentration of KA. It should be emphasized that *A. niger* is a producer of other organic acids, which could generate interference by having a moderately acidic pH of the medium. In a study presented by Rosfarizan, *et al.* [12], they mention that as the pH decreases, in addition to glucose reduction KA can be accumulated, but accompanied by other organic acids such as oxalic, succinic, lactic and citric acids.

When the culture medium is used at initial pH 5.5, there is an increase in KA production after 72 h remaining constant until 120 h. Chib, *et al.* [19] mentioned that during their fermentative process in the production of KA, the pH of the medium increased from 5 to 6.2 at 96 h, which did not interfere in the production of KA when using *A. sojae*, resulting in the production 12.2 g KA/L at 28°C in 120 h. While Badar, *et al.* [22], report that the yield of KA by *A. oryzae* strain was affected when high agitation and pH conditions were applied, obtaining at day 20 concentrations of 5.0, 3.0, 2.0, 1.6, 1.1 and 0.5 g KA/L at pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 and 8.5. On the other hand, Bala, *et al.* [51] revealed that in 28 days at 29°C under the culture medium optimized, a pH of 6.0 is required to produce a maximum yield of 60 g KA/L with the *A. flavus* strain. Even *A. niger* requires an initial pH 6.5 to produce other compounds such as citric acid, which is reduced to pH 1.5, forming other compounds [52]. Therefore, it can be attributed to the fact that most fungi show extensive growth and sporulation in a weakly acidic to neutral environment, giving them

the opportunity to produce a greater number of organic acids [24]. The KA production was slightly affected by the pH 3.5 of the medium, producing half of the KA. According to the reports, the pH in the fermentative media is essential and favors the production of KA. For example, the production has an improvement with pH 5.0 [24, 53], while other authors mention that a pH 6.0 was favorable for the production of KA [51]. In other cases, the pH 5.0 which increases at pH 6.2 during fermentation, does not influence the production of KA [19]. However, for *A. niger* it is essential to start a fermentative stage with a weakly acidic to neutral pH, to achieve synthesis of KA. So it is required that the initial pH of the culture media must be optimized, so that it can be adapted to the microorganism, substrate, and the production method [54]. Up to what is currently reported, there are some species that produce KA, among which *A. oryzae* and *A. flavus* stand out, followed by *A. parasiticus*, *A. sojae*, *A. terreus*, and *A. fumigatus*. Some authors have chosen to use different means to improve productivity, replacing some carbon sources with cheap substrates, such as corn, straw, or grape waste, to make KA production efficient. In addition, KA production has been studied by mutagenesis, and other technologies that allow the detection of groups of genes that stimulate KA synthesis. On the other hand, *A. niger* is a fungus, which is widely used in the food industry as a producer of organic acids, commercially of citric acid, for which the approaches have been supported only with the aforementioned producer strains. In this experiment, we decided to use a medium similar to those reported, with a different concentration in the nitrogen source to induce the synthesis of KA, however, the productivity was lower, compared to which is obtained with other strains. Chang, *et al.* [42], identified a grouped of genes of *A. flavus* that modulate the synthesis of KA, within their research is *A. niger*, which contains a single group of KA genes being a kojR homologue (AN09g05060), which encodes a protein with 63% amino acid sequence identity to the *A. oryzae* KojR proteins [55]. It is also mentioned that the kojR gene of *A. flavus* was involved in the production of KA [42]. So probably the induction of kojic acid by *A. niger* requires the interference of other physicals or chemical methods. These variations could be: different temperatures, exposure to UV radiation, agitation, and also the use of other sources of carbon and nitrogen, that allows to potentiating production and reducing costs.

The use of a quantification method previously described by HPLC, helped to verify that KA was produced using the *A. niger* M4 strain. With pH 3.5, were obtained 0.3963 g KA/L at 72 h, while at pH 5.5, were produced 0.9310 g KA/L at 120 h. The variation in terms of KA quantification between the spectrophotometric method and HPLC may lie in interferences. When measuring coloration, only the KA that has reacted with FeCl<sub>3</sub> can be measured, while in HPLC the molecule is detected in the retention times of the standard, giving greater certainty of the presence of KA in the samples, according to the area and retention times. Nevertheless, the colorimetric method could be used as a quick and reliable technique for KA measurement. The data presented by Promsang, *et al.* [23], using HPLC achieved a KA production of 1.5 g KA/L in a retention time of 4.24 min, using *A. oryzae*. The *A. niger* fungus has distinguish for being a good producer of organic acids, and also, of different enzymes such as amylases, invertase, pectinases, phytases, and proteinases [56]. Although, *A. niger* has not been reported as a strain that produces KA. Recently, in a study conducted by Li, *et al.* [16], who constructed seven histone deacetylase-deficient strains of *A. niger*, to investigate the metabolic profiles of secondary metabolic pathways, according to metabolomic analysis, KA production increase in the HosA mutant, suggesting that HosA histone deacetylases play an important role in the biosynthesis of secondary metabolites in *A. niger* FGSC A1279.

Although the production of kojic acid in this investigation is quantitatively low, it could be decided to carry out future investigations where the fungus can be subjected to stress due to temperature, UV radiation, agitation, immobilization, in addition to using other kinds of carbon sources, such as industrial waste or other sources of nitrogen, in order to potentiate production and lowering costs.

## 5. Conclusions

The *Aspergillus niger* M4 strain was able to growth in liquid medium with different yeast extract levels. The maximum growth rate in the fermentation conditions is related to the yeast extract concentration, besides the kojic acid production. The addition of zinc sulfate during the fermentation process did not increase the growth rate nor the product-biomass yield.

The kojic acid synthesis can be induced into *A. niger* M4 strain varying the yeast extract concentration up to 2.5 g/L. The pH in the culture medium affected slightly the kojic acid production, but the pH values near the neutral could increase the metabolite synthesis and fungal growth speed.

Further investigation could be made seeking for cheaper carbon sources, such as agroindustrial or agricultural wastes, in form of vegetal biomass.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R.O.; methodology, A.R.O., and S.G.M.; software, A.R.O.; validation, A.B.M., F.F.L., J.M.M. and J.A.G.F.; formal analysis, A.R.O. and S.G.M.; investigation, T.Q.G.; resources, A.R.O. and S.G.M.; data curation, J.M.M.; writing—original draft preparation, T.Q.G.; writing—review and editing, A.R.O.; visualization, A.R.O.; supervision, A.R.O.; project administration, A.R.O.; funding acquisition, A.R.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, grant number 30-38111-425204001-2408.

**Acknowledgments:** Student Tomasa Quiterio Gutiérrez acknowledge CONACYT for the grant during her doctorate studies.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

- Hu H.C.; Li C.Y.; Tsai Y.H.; Yang D.Y.; Wu Y.C.; Hwang T.L.; Chen S.L.; Fülöp F.; Hunyadi A.; Yen C.H.; Cheng Y.B., and Chang F.R. "Secondary metabolites and bioactivities of *Aspergillus ochraceopetaliformis* isolated from *Anthurium brownii*." *ACS Omega* **2020** 5, no. 33: 20991-99.
- Xie H.; Ma Q.; Wei D.Z., and Wang F.Q. "Transcriptomic analysis of *Aspergillus niger* strains reveals the mechanism underlying high citric acid productivity." *Bioresources and Bioprocessing* **2018** 5, no. 1: 1-23.
- Lu Y.; Zheng X.; Wang Y.; Zhang L.; Wang L.; Lei Y.; Zhang T.; Zheng P., and Sun J. "Evaluation of *Aspergillus niger* Six Constitutive Strong Promoters by Fluorescent-Auxotrophic Selection Coupled with Flow Cytometry: A Case for Citric Acid Production." *Journal of Fungi* **2022** 8, no. 6: 568-68.
- Happi G.M.; Kouam S.F.; Talontsi F.M.; Nkenfou C.N.; Longo F.; Zühlke S.; Douanla-Meli C., and Spitteller M. "A new dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone from an endophytic fungus *Aspergillus Niger* AKRN associated with the roots of *Entandrophragma congoense* collected in Cameroon." *Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences* **2015** 70, no. 9: 625-30.
- Yu R.; Liu J.; Wang Y.; Wang H., and Zhang H. " *Aspergillus niger* as a Secondary Metabolite Factory." *Frontiers in Chemistry* **2021** 9: 434-34.
- Saeedi M.; Eslamifar M., and Khezri K. "Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations." *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019** 110: 582-93.
- Kim J.H., and Chan K.L. "Augmenting the Antifungal Activity of an Oxidizing Agent with Kojic Acid: Control of *Penicillium* Strains Infecting Crops." *Molecules* **2014**, Vol. 19, Pages 18448-18464 **2014** 19, no. 11: 18448-64.
- Zhu G.Y.; Shi X.C.; Wang S.Y.; Wang B., and Laborda P. "Antifungal Mechanism and Efficacy of Kojic Acid for the Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean." *Frontiers in Plant Science* **2022** 13: 845698-98.
- Chen Y.H.; Lu P.J.; Hulme C., and Shaw A.Y. "Synthesis of kojic acid-derived copper-chelating apoptosis inducing agents." *Medicinal Chemistry Research* **2013** 22, no. 2: 995-1003.
- Shah H.M.S.; Khan A.S., and Ali S. "Pre-storage kojic acid application delays pericarp browning and maintains antioxidant activities of litchi fruit." *Postharvest Biology and Technology* **2017** 132: 154-61.
- Shakibaie M.; Ameri A.; Ghazanfarian R.; Adeli-Sardou M.; Amirpour-Rostami S.; Torkzadeh-Mahani M.; Imani M., and Forootanfar H. "Statistical optimization of kojic acid production by a UV-induced mutant strain of *Aspergillus terreus*." *Brazilian Journal of Microbiology* **2018** 49, no. 4: 865-71.
- Rosfarizan M.; Ariff A.; Hassan A., and Karim M. "Influence of pH on Kojic Acid Fermentation by *Aspergillus flavus*." *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2000** 3, no. 6: 977-82.
- Karkeszová K.; Mastihubová M., and Mastihuba V. "Regioselective enzymatic synthesis of kojic acid monoesters." *Catalysts* **2021** 11, no. 12: 1430-30.
- Liu J.M.; Yu T.C.; Lin S.P.; Hsu R.J.; Hsu K.D., and Cheng K.C. "Evaluation of kojic acid production in a repeated-batch PCS biofilm reactor." *Journal of Biotechnology* **2016** 218: 41-48.
- Sauer M.; Mattanovich D., and Marx H. "Microbial production of organic acids for use in food." *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals* **2013**: 288-320.
- Li X.; Pan L.; Wang B., and Pan L. "The histone deacetylases HosA and HdaA affect the phenotype and transcriptomic and metabolic profiles of *Aspergillus niger*." *Toxins* **2019** 11, no. 9: 520.
- Rosfarizan M., and Ariff A.B. "Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **2000** 25, no. 1: 20-24.
- Terabayashi Y.; Sano M.; Yamane N.; Marui J.; Tamano K.; Sagara J.; Dohmoto M.; Oda K.; Ohshima E., and Tachibana K. "Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*." *Fungal Genetics and Biology* **2010** 47, no. 12: 953-61.
- Chib S.; Dogra A.; Nandi U., and Saran S. "Consistent production of kojic acid from *Aspergillus sojae* SSC-3 isolated from rice husk." *Molecular biology reports* **2019** 46, no. 6: 5995-6002.
- Ariff A.B.; Salleh M.S.; Ghani B.; Hassan M.A.; Rusul G., and Karim M.I.A. "Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* link." *Enzyme and Microbial Technology* **1996** 19, no. 7: 545-50.

21. Rosfarizan M.; Ariff A.; Hassan M., and Karim M. "Kojic acid production by *Aspergillus flavus* using gelatinized and hydrolyzed sagostarch as carbon sources." *Folia microbiologica* **1998** 43: 459-64.
22. Badar R.; Yaqoob S.; Ahmed A., and Shaoor Q. "Screening and optimization of submerged fermentation of *Aspergillus* species for kojic acid production." *Research Square* **2021**.
23. Promsang A.; Rungsardthong V.; Thumthana ruk B.; Puttanlek C.; Uttapap D.; Foophow T.; Phalathana porn V., and Vatanyoopaisam S. "Effect of culture conditions and medium compositions on kojic acid production by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124." Paper presented at the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019.
24. Ammar H.A.M.; Ezzat S.M., and Houseny A.M. "Improved production of kojic acid by mutagenesis of *Aspergillus flavus* HAK1 and *Aspergillus oryzae* HAK2 and their potential antioxidant activity." *3 Biotech* **2017** 7, no. 5.
25. Mahmoud G.A.E., and Zohri A.N.A. "Amendment stable kojic acid produced by non-toxicogenic *Aspergillus oryzae* using five levels central composite design of response surface methodology: Stable kojic acid production." *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* **2021** 10, no. 6: e2683-e83.
26. Kwak M.Y., and Rhee J.S. "Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production." *Biotechnology and bioengineering* **1992** 39, no. 9: 903-06.
27. Wan C.; Zhang M.; Fang Q.; Xiong L.; Zhao X.; Hasunuma T.; Bai F., and Kondo A. "The impact of zinc sulfate addition on the dynamic metabolic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* subjected to long term acetic acid stress treatment and identification of key metabolites involved in the antioxidant effect of zinc." *Metallomics* **2015** 7, no. 2: 322-32.
28. Coupland K., and Niehaus Jr W.G. "Effect of nitrogen supply, Zn<sup>2+</sup>, and salt concentration on kojic acid and versicolorin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*." *Experimental mycology* **1987** 11, no. 3: 206-13.
29. Miller G.L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* **1959** 31, no. 3: 426-28.
30. Bentley R. "[41] Preparation and analysis of Kojic acid." In *Methods in Enzymology*, 238-41: Academic Press, 1957.
31. Brand-Williams W.; Cuvelier M.E., and Berset C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology* **1995** 28, no. 1: 25-30.
32. Re R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M., and Rice -Evans C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology and Medicine* **1999** 26, no. 9-10: 1231-37.
33. Robledo A.; Aguilera-Carbo A.F.; Prado-Barragan A.; Sepulveda-Torre L.; Rodriguez-Herrera R.; Contreras-Esquivel J.C., and Aguilar C.N. "Kinetics of ellagic acid accumulation by solid-state fermentation." In *Theoretical Models and Experimental Approaches in Physical Chemistry: Research Methodology and Practical Methods*, 267, 2018.
34. de Caldas Felipe M.T.; do Nascimento Barbosa R.; Bezerra J.D.P., and de Souza-Motta C.M. "Production of kojic acid by *Aspergillus* species: Trends and applications." *Fungal Biology Reviews* **2023** 45: 100313.
35. Apak R.; Güçlü K.; Demirata B.; Özyürek M.; Çelik S.E.; Bektaşoğlu B.; Berker K.I., and Özyurt D. "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay." *Molecules* **2007** 12, no. 7: 1496-547.
36. Sridhar K., and Charles A.L. "In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: Estimation methods for EC50 using advanced statistical programs." *Food Chemistry* **2019** 275: 41-49.
37. Ola A.R.B.; Metboki G.; Lay C.S.; Sugi Y.; De Rozari P.; Darmakusuma D., and Hakim E.H. "Single Production of Kojic Acid by *Aspergillus flavus* and the Revision of Flufuran." *Molecules* **2019**, Vol. 24, Page 4200 **2019** 24, no. 22: 4200-00.
38. Copetti M.V. "Fungi as industrial producers of food ingredients." *Current Opinion in Food Science* **2019** 25: 52-56.
39. Lassfolk R.; Suonpaä A.; Birikh K., and Leino R. "Chemo-enzymatic three-step conversion of glucose to kojic acid." *Chemical Communications* **2019** 55, no. 98: 14737-40.

40. Mohamad R.; Mohamed M.S.; Suhaili N.; Salleh M.M., and Ariff A.B. "Kojic acid: applications and development of fermentation process for production." *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **2010** 5, no. 2: 24-37.
41. Hassan H.; Saad A.; Hazzaa M., and Ibrahim E. "Optimization study for the production of kojic acid crystals by *Aspergillus oryzae* var. *effusus* NRC 14 isolate." *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **2014** 3, no. 10: 133-42.
42. Chang P.-K.; Scharfenstein L.L.; Mahoney N., and Kong Q. "Kojic Acid Gene Clusters and the Transcriptional Activation Mechanism of *Aspergillus flavus* KojR on Expression of Clustered Genes." *Journal of Fungi* **2023** 9, no. 2: 259.
43. Rasmey A.-H.M., and Abdel-Kareem M. "Optimization of culture conditions for Kojic acid production in surface fermentation by *Aspergillus oryzae* isolated from wheat grains." *Bulletin of Pharmaceutical Sciences. Assiut* **2021** 44, no. 1: 201-11.
44. Sanjotha G.; Shivasharana C.T., and Manawadi S.I. "An in vitro approach for evaluating antimicrobial activity and production of kojic acid by *Aspergillus flavus* isolated from Karwar region." *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2019** 13, no. 4: 2261-72.
45. Saraphanchotiwitthaya A., and Sripalakit P. "Kojic acid production from rice by *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 and *Aspergillus oryzae* TISTR 3259 and its cosmeceutical potential." *ScienceAsia* **2019** 45, no. 6: 525-31.
46. Hazzaa M.; Saad A.; Hassan H., and Ibrahim E. "High production of kojic acid crystals by isolated *Aspergillus oryzae* var. *effusus* NRC14." *J Appl Sci Res* **2013** 9, no. 3: 1714-23.
47. Futamura T.; Okabe M.; Tamura T.; Toda K.; Matsunobu T., and Park Y.S. "Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39." *Journal of bioscience and bioengineering* **2001** 91, no. 3: 272-76.
48. Ariff A.; Rosfarizan M.; Herng L.; Madihah S., and Karim M. "Kinetics and modelling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in batch fermentation and resuspended mycelial system." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **1997** 13: 195-201.
49. Rosfarizan M., and Ariff A.B. "Kinetic of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* Link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2006** 11, no. 1: 72-79.
50. El-Kady I.A.; Zohri A.N.A., and Hamed S.R. "Kojic Acid Production from Agro-Industrial By-Products Using Fungi." *Biotechnology Research International* **2014** 2014: 1-10.
51. Bala K.; Devi D.; Vijayalakshmi P.; Shilpa V.; Prasad V., and Veerendra Kumar B. "Response Surface Methodology for the Optimization of Kojic Acid Production by *Aspergillus Flavus* using *Muntingia Calabura* Fruits as a Carbon Source." *Indian Journal of Science and Technology* **2015** 8, no. 6: 556-61.
52. Ramesh T., and Kalaiselvam M. "An Experimental Study on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using *Gelidiella acerosa* as a Substrate." *Indian Journal of Microbiology* **2011** 51, no. 3: 289-89.
53. Katagiri H., and Kitahara K. "THE FORMATION OF KOJIC ACID BY ASPERGILLUS ORYZAE PART I. THE FORMATION OF KOJIC ACID FROM PENTOSE, SUGAR ALCOHOLS AND GLUCONIC ACID." *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* **1929** 5, no. 6-9: 38-47.
54. Show P.L.; Oladele K.O.; Siew Q.Y.; Aziz Zakry F.A.; Lan J.C.W., and Ling T.C. "Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*." *Frontiers in life science* **2015** 8, no. 3: 271-83.
55. Marui J.; Yamane N.; Ohashi-Kunihiro S.; Ando T.; Terabayashi Y.; Sano M.; Ohashi S.; Ohshima E.; Tachibana K., and Higa Y. "Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn (II) 2Cys6 transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level." *Journal of bioscience and bioengineering* **2011** 112, no. 1: 40-43.
56. Ellena V., and Steiger M.G. "The importance of complete and high-quality genome sequences in *Aspergillus niger* research." *Frontiers in Fungal Biology* **2022** 3: 41-41.



**ARTÍCULO**

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSTCOSECHA DE FRESAS SUMERGIDAS  
EN UN EXTRACTO DE FERMENTACIÓN RICO EN ÁCIDO KÓJICO

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD POSTCOSECHA DE FRESAS SUMERGIDAS EN UN EXTRACTO DE FERMENTACIÓN RICO EN ÁCIDO KÓJICO

Tomasa Quiterio Gutiérrez<sup>1,2\*</sup>, Armando Robledo Olivo<sup>2</sup>, Susana González Morales<sup>3</sup>,  
José Antonio González Fuentes<sup>4</sup>, Adalberto Benavides Mendoza<sup>4</sup>, Ana Verónica Charles  
Rodríguez<sup>2</sup>, Fabián Fernández Luqueño<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Agricultura Protegida, UAAAN, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup>Grupo Agroalimentario de Bioprocesos. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, UAAAN, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>3</sup>CONACYT-UAAAN, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>4</sup>Departamento de Horticultura, UAAAN, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>5</sup>Cinvestav-Unidad Saltillo, Coahuila, México.

\*Presenting author: [armando.robledo@outlook.com](mailto:armando.robledo@outlook.com)

### RESUMEN

Las fresas son fruto accesorio (desarrollada a partir del receptáculo) que contienen compuestos bioactivos como azúcares, ácido ascórbico y compuestos fenólicos, sin embargo, por sus características físicas, al ser frutos de piel delicada, su periodo de almacenamiento se vuelve limitado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un extracto de fermentación rico en ácido kójico (EKA) sobre la calidad postcosecha de frutos de fresa. Se aplicaron las diferentes concentraciones: T0: control con agua destilada solamente, 2 mL/L, 4 mL/L, 8 mL/L (EAK) y ácido kójico 0,5% grado reactivo. De acuerdo con los resultados obtenidos, la firmeza, la pérdida de peso (PP) y el índice de color, solo los tratamientos 2 mL/L y 8 mL/L de eak y 0,5% de AK tuvieron resultados menores en los días de almacenamiento. Mientras que los sólidos solubles totales (TSS), % ácido cítrico, eliminación de radicales libres DPPH, fenoles totales y vitamina C aumentaron con la aplicación de todos los tratamientos a partir del día 4. Por lo tanto, la aplicación de los diferentes tratamientos antes del proceso de almacenamiento modifica

las propiedades físicas de los frutos en postcosecha, ayudándolos de manera eficiente, postergando su deterioro y pérdida de compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** fresa, calidad de fruto, propiedades físico-químicas, antioxidantes

## 1. INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria × ananassa* Duch) es una fruta pequeña importante que se cultiva a nivel mundial (Bajpai *et al.*, 2019). La fresa se encuentra entre una de las mejores fuentes de compuestos biológicamente activos, con un sabor aceptable, altos niveles de fibra, azúcares, vitaminas, minerales, carotenoides, así como ácido ascórbico, potasio, compuestos fenólicos y otros antioxidantes (Galli *et al.*, 2016; Taş *et al.*, 2021), además de propiedades anticancerígenas, los frutos tienen gran importancia en la nutrición humana (Mozafari *et al.*, 2018). Los frutos se destacan por su rápido deterioro con una vida útil de postcosecha muy corta, lo que hace que sean frutos susceptibles ante la presencia de hongos, perdiendo la calidad de fruto (Shiow *et al.*, 2013; Colussi *et al.*, 2021). Generalmente las fresas se pueden almacenar por periodos de 2 a 3 días en condiciones de temperatura ambiente, por lo que se deben considerar diferentes estrategias para la protección de la calidad de los frutos durante su almacenamiento (Zheng *et al.*, 2022). Por ende, las prácticas de postcosecha tienen como objetivo disminuir la tasa de respiración y la pérdida de agua, mantener la firmeza de la fruta y minimizar el crecimiento de patógenos (Azam *et al.*, 2018). Los frutos de fresa al tener una textura suave llegan a ser sensibles a las lesiones por el mal manejo y al deterioro (Taş *et al.*, 2021), además los frutos se ven afectados también por el pardeamiento reduciendo la vida útil y el valor de mercado (Peng *et al.*, 2023). Entre uno de los factores importantes que ayudan a determinar la calidad y comercialización de los cultivos hortícolas es la pérdida de peso, por lo que, aplicaciones previas o posteriores a la cosecha de diferentes productos alimentarios disminuyen la pérdida de agua y conducen a una mejor calidad (El-beltagi *et al.*, 2023). Se ha optado por utilizar el ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil- $\gamma$ -pirona AK) como un metabolito secundario con diferentes características ácido débiles que le permiten tener diversas aplicaciones, una de ellas en la industria alimentaria (Saeedi *et al.*, 2019), como un antioxidante natural y prolongador de la vida de anaquel de diferentes

productos alimenticios (Wang *et al.*, 2023). Algunos de los usos del ácido kójico son como antioxidante, conservante, aditivo alimentario para prevenir la decoloración enzimática de vegetales, frutos, cangrejos y camarones, y como agente aclarante o blanqueador de la piel en preparaciones cosméticas (Chen *et al.*, 2013; Shah & Ali, 2017; Muhammad *et al.*, 2017), con efectos antifúngicos (Kim & Chan, 2014; Zhu *et al.*, 2022). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un extracto de fermentación rico en ácido kójico (EKA) y ácido kójico grado reactivo sobre la calidad postcosecha de frutos de fresa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Preparación del extracto de ácido kójico

Se preparó un extracto a base de ácido kójico el cual consistió en: 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.05% g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , y 0.25% de extracto de levadura, con una inoculación de  $1 \times 10^{-6}$  UFC de *A. niger*, también se consideró el uso de ácido kójico grado reactivo (Sigma Aldrich), preparado al 0.5%. El ácido kójico se ha aplicado en diferentes alimentos en porcentajes que van desde 0.05% hasta 1% generalmente es lo reportado en alimentos/cosméticos (Sha H *et al.*, 2017).

### 2.2 Desarrollo experimental

Se seleccionaron frutos de fresa de tamaño y coloración similar verificando que no tuvieran daño en la superficie. Posteriormente se seleccionaron 24 frutos por cada tratamiento, los cuales fueron sumergidos por 5 minutos, bajo los siguientes tratamientos: T0: agua destilada, 2 mL/L eak, 4 mL/L eak, 8 mL/L eak (extracto de ácido kójico), y AK: ácido kójico al 0.5% (Sigma Aldrich), posteriormente fueron colocados en charolas de polietileno las cuales se le hicieron pequeñas perforaciones en la superficie de la tapa, después se colocaron en refrigeración (Cuarto frío) por 10 días a  $4^\circ\text{C} \pm 0.5$ . Los días de evaluación fueron: 0, 2, 4, 6, 8, 10 días.

### 2.3 Evaluación de la calidad de fruto

### 2.4 Pérdida de peso:

Para la determinación de la pérdida de peso, se consideraron cuatro frutos por cada día de evaluación. Comparándose la diferencia de peso del día inicial con el día de evaluación

correspondiente. El peso fue expresado como pérdida de peso. Mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Weight Loss (\%)} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} * 100$$

$M_0$  es el peso fresco inicial, y  $M_1$  es el peso medido en cada día de muestreo (Zhang *et al.*, 2018).

### 2.5 Firmeza

La firmeza de los frutos se midió con un penetrómetro con un diámetro de punta de 6 mm (Penetrómetro Extech Instruments). Se usaron dos ubicaciones diferentes para medir la firmeza a los costados de la región ecuatorial de cada fruto. La máxima de la fuerza se expresó en N-cm<sup>3</sup>.

### 2.6 Coloración

Se utilizó un colorímetro (Chroma Meter CR-400) para determinar la coloración de la superficie de los frutos, midiendo los valores: parámetro L proporciona un valor de la luminancia o brillo de la muestra.,  $a^*$  (rojo/verde) y  $b^*$  (amarillo/azul) (Vignoni *et al.*, 2006). En cada uno de los frutos se midió tres puntos. Los resultados se expresaron como índice de coloración IC utilizando la siguiente fórmula:

$$IC^* = \frac{a^*1000}{L^* b}$$

### 2.7 °Brix

La medición se realizó con un refractómetro manual, se colocaron 3 gotas de jugo de fresa sobre la superficie del prisma, se observó a través del lente, y el valor obtenido fue reportado como °Brix.

### 2.8 Acidez titulable

Para la medición de acidez titulable se hizo mediante el método descrito en AOAC 1990. Se utilizó un fruto y se maceró perfectamente, se tomaron 10 mL del macerado, y se le

agregaron 2 gotas de fenoftaleína, y se tituló con NaOH (0.1N). Los datos se expresaron como % ácido cítrico.

### 2.9.1 Vitamina C

El contenido de vitamina C se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). Para la muestra de fruto se pesaron 10 gramos de peso fresco, posteriormente se maceraron en un mortero de porcelana con 10 mL de HCl al 2%, se homogenizó perfectamente, posteriormente se filtró a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz aforación, y después se aforo a 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado y se tituló con 2-6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente. El contenido de vitamina C se expresa en  $\text{mg}^{-1} 100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco.

### 2.9.2 Extracción de moléculas

Para la extracción de la muestra se utilizó el método descrito por Zhang *et al.*, 2018, con algunas modificaciones. Consistió en pesar 10 g de muestra, posteriormente se mezcló con metanol al 80%, las fresas se trituraron con un mortero de porcelana y se añadieron en volumen final 100 mL de metanol al 80%. Posteriormente se centrifugó a 12500 rpm por 30 minutos a 4°C, después se tomó el sobrenadante y se filtró con una membrana nylon de 0.45 mm, el extracto obtenido se utilizó para determinar fenoles totales, y la actividad de eliminación de radicales libres DPPH.

### 2.9.3 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron utilizando el método de Singleton *et al.*, 1999. En un tubo de ensaye se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de extracto, 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%, y se añadieron 5 mL de agua destilada, se agitó en vortex por 30 segundos. Las muestras se pasaron a baño maría a 45°C durante 30 minutos. Después se tomó la lectura a 750 nm utilizando lector de microplaca (BIOBASE, model BK-EL10C, No, 51 South Gongye Road, Jinan, China). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco ( $\text{mg g}^{-1}$  PF).

#### 2.9.4 La actividad de eliminación de radicales libres de DPPH

Para la actividad DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) se realizó de acuerdo con Brand-Williams *et al.*, 1995. Se preparó una solución DPPH a 0.1 mM en 100 mL de metanol al 80%. La absorbancia de la solución se ajustó a  $0.700 \pm 0.02$  a 520 nm utilizando lector de placas (BIOBASE, modelo BK-EL10C, No, 51 South Gongye Road, Jinan, China). Para determinar la capacidad antioxidante en una placa se agregó 6  $\mu$ L de extracto y se añadió 234  $\mu$ L del radical DPPH. La disminución de la absorbancia se midió después de 30 minutos de reposo en oscuridad. The results were expressed as DPPH scavenging activity and were calculated according to the formula descrita por Zhang *et al.*, 2018:

$$DPPH \text{ radical scavenging activity (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbance sample}}{\text{Absorbance control}} \times 100\%$$

#### 2.9.8 Análisis estadístico

Para cada una de las variables de calidad evaluadas se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento y por día de evaluación. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de diferencia significativa (LSD) de Fisher ( $p < 0.05$ ). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat (2020v).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los problemas en la industria alimentaria es la descomposición de los frutos durante su almacenamiento, dando como resultado pérdidas y frutos de baja calidad, dificultando la comercialización de la fruta (Wang *et al.*, 2022). En el presente estudio se muestran los resultados de firmeza, pérdida de peso, índice de color, acidez titulable (% ácido cítrico), sólidos solubles totales ( $^{\circ}$ Brix), eliminación de radicales libres por DPPH, fenoles totales y vitamina c, presentándose diferencias significativas en al menos uno de los tratamientos durante el proceso de almacenamiento. Una cualidad de los frutos es la firmeza sobre todo en las bayas, ya que el ablandamiento es un factor importante que indica el deterioro de la calidad del fruto (Yan *et al.*, 2019). Los resultados de firmeza se muestran en la Figura 1, conforme transcurría el tiempo de almacenamiento los frutos tendían a ser más blandos, sin embargo, en el día 6 con la aplicación de 0.5% de AK la firmeza de los frutos fue más alta siendo de 7.94 N, mientras que el T0 fueron frutos con

firmeza de 4.38N, por otra parte, la aplicación de 8 mL y 2 mL de eak tuvieron firmeza de 6.54 N Y 6.26 N, pero no fueron diferentes del T0. Las fresas se ablandan durante el almacenamiento, dando como resultado una vida de postcosecha corta y susceptible a la contaminación por microorganismos, además la degradación de la lámina por medio de la pared celular, el contacto entre células y la turgencia celular puede influir en la firmeza de los frutos (Nazoori *et al.*, 2020).

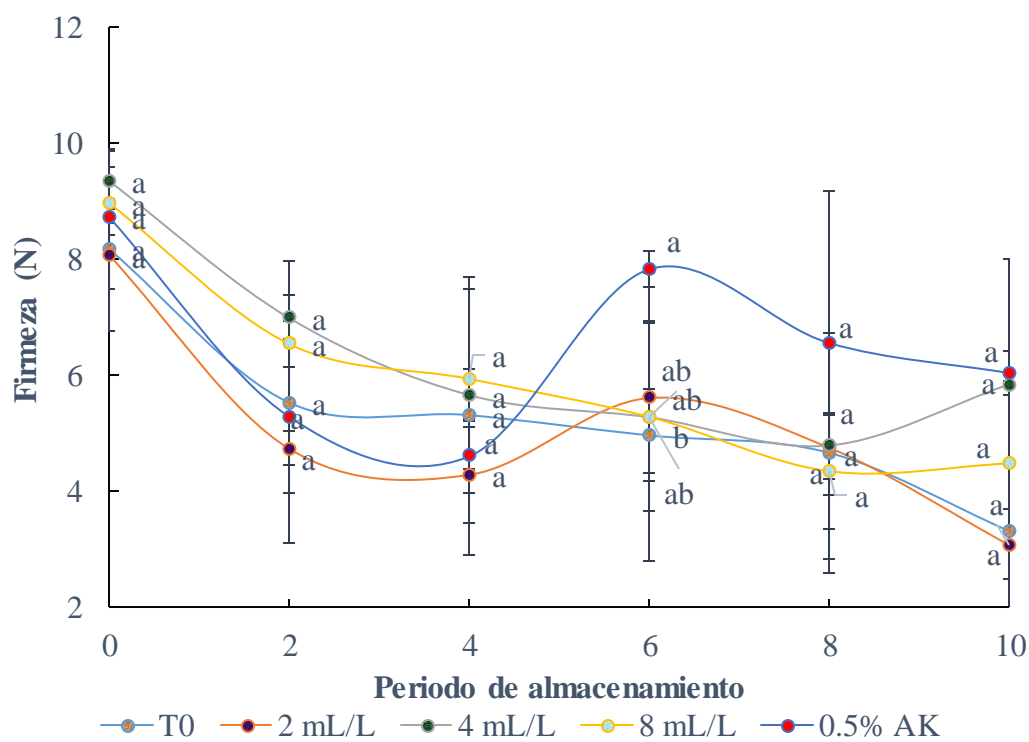


Figura 1. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en la firmeza de los frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

Para la variable pérdida de peso (Figura 2) en los frutos se presentó diferencia significativa para los días 2 y 8 de almacenamiento, como se puede observar en la Figura 2. A partir del día 2 los frutos disminuyeron su peso, pero el tratamiento 2 mL/L eak disminuyó un 36% menos que el T0. En los días 4 y 6 no se presentaron diferencias significativas. Mientras que para el día 8 los tratamientos que tuvieron menor pérdida de peso fueron 8 mL/L y 2 mL/L de eak en un 46 y 28% menos que el T0. En el día 10 mismos tratamientos (8 mL/L y 2 mL/L de eak) tuvieron menor pérdida de peso de 7.55% y 7.62% pero no



fueron diferentes de T0 que fue de 9.21%. Algunos autores como Sha H *et al.*, 2017, reportaron que frutos de litchi tratados con AK comercial en concentraciones de 4 mmol L<sup>-1</sup> redujo la pérdida de peso de frutos en comparación con frutos no tratados con AK después de 20 días de almacenamiento atribuyendo una posible reducción en la pérdida de humedad debido a la integridad de la membrana. La pérdida de peso en los frutos a través de los días de almacenamiento podría ser por la degradación de las paredes celulares de la fresa, por consiguiente, existe una pérdida de agua por parte de las células (Colussi *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2022). Por lo tanto, el uso de 2 mL/L y 8 mL/L de eak ayudaron a tener menor pérdida de peso, incluso la aplicación fue mejor en su forma de extracto que en forma AK comercial.

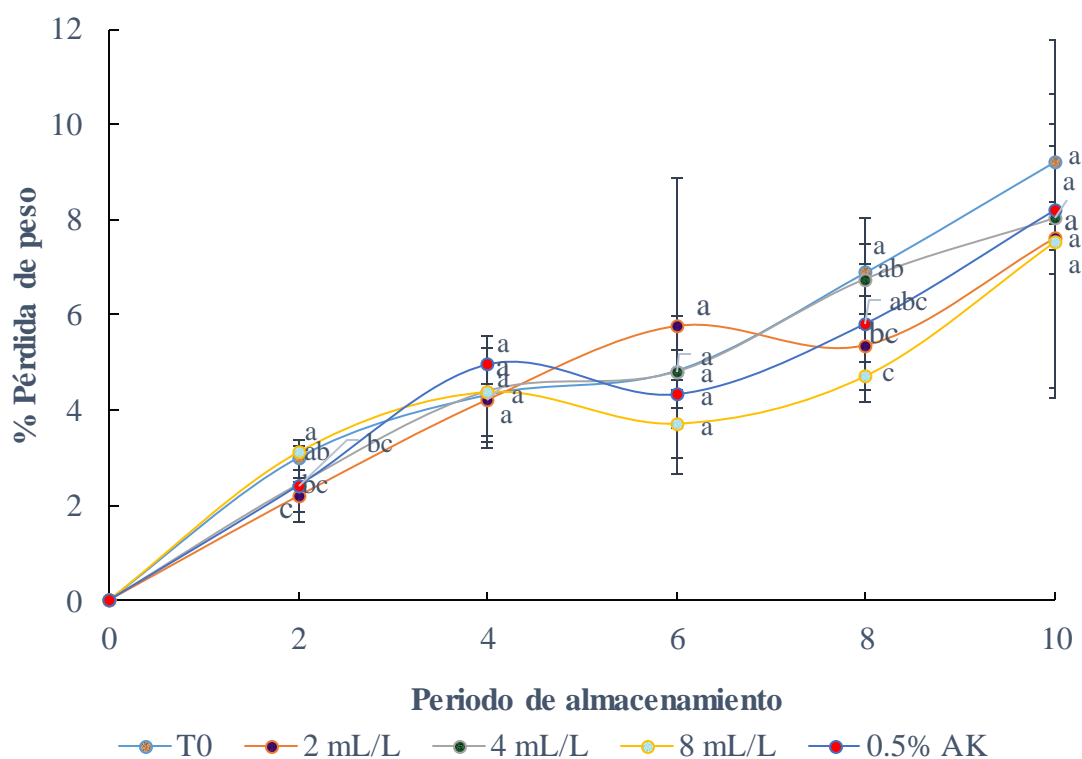


Figura 2. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en la pérdida de peso de los frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

Es importante hacer la valoración del color de la superficie de los frutos de fresa para evaluar la calidad y el proceso de maduración (Petriccione *et al.*, 2015). Para la coloración superficial de los frutos se consideró expresarse en índice de coloración (IC), los

resultados se muestran en la Figura 4, como se observa, para los frutos T0 que es el control, el IC inicial fue de 63.97, y para el día 8, 52.95 IC, con el uso de 2 mL/L de eak el inicial fue de 83.28 IC y para el día 10 la disminución fue a 60.37 IC, para los 4 mL/L de eak 73.26 IC, para el día 8 la disminución fue a 58.29 IC, en los 8 mL/L de eak, valor inicial 78.24 IC valor final más bajo para el día 8, a 59.69 IC, con 0.5% AK, valor inicial 88.91 IC, valor final 55.61 IC. En un estudio preliminar realizado por Peng *et al.*, 2023, en manzanas se midió la coloración de frutos, con la aplicación previa de 44.4  $\mu$ M de AK comercial y un derivado de ácido kójico 6J, la coloración fue disminuyendo gradualmente demostrando que conforme pasaban los días de conservación se producía un ligero pardeamiento, sin embargo, el compuesto 6j tuvo mayor efecto inhibitorio del pardeamiento en frutos en comparación con AK comercial, y el control.

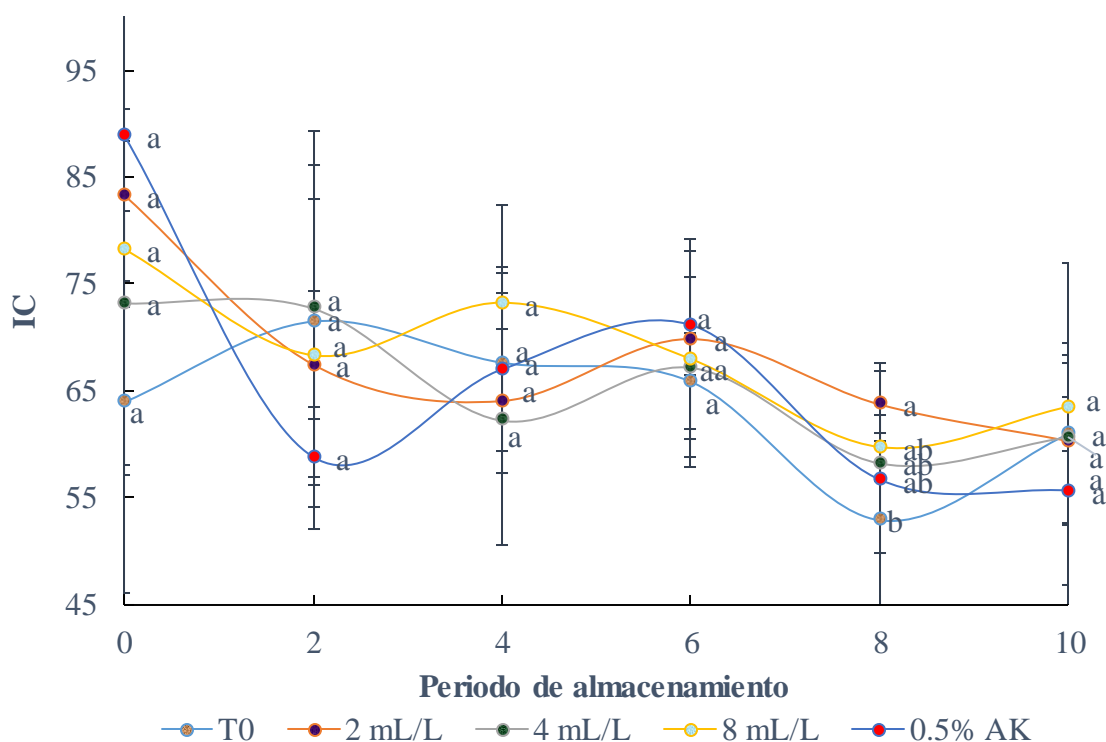


Figura 3. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en la coloración de los frutos de fresa, IC: índice de color. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

Cuando el metabolismo de los frutos de fresa aumenta regularmente el contenido de ácido cítrico disminuye estando relacionados con el sabor (Zhang *et al.*, 2018). Para el porcentaje de ácido cítrico se presentaron diferencias significativas entre los días de

almacenamiento (Figura 4). El día inicial los frutos tuvieron menor contenido de acidez, por lo tanto, conforme al periodo de almacenamiento transcurrió el % de ácido cítrico fue incrementando. A partir del día 2, los frutos con menor acidez fueron los del tratamiento 8 ml/l eak y 0.5%AK en un 19% y 21% comparados con T0. Mientras que al día 4 no se presentaron diferencias. Para el día 6, los tratamientos con mayor acidez fueron 0.5% AK, 8 mL/L, 4 mL/L de eak en un 13%, 11%, 6% comparados con T0. En el día 8, el tratamiento 2 ml/l de eak y 0.5%AK, tuvieron mayor acidez en un 12% y 7% comparados con T0. Y finalmente a los 10 días de almacenamiento el mayor incremento fue para el tratamiento 4 mL/L de eak de un 11% más que T0, mientras que con el uso de 0.5% AK grado reactivo la acidez disminuyó en un 28% comparado con T0. En un estudio realizado por Tas *et al.*, 2021, refieren a que el ácido cítrico aumentó 9 veces más conforme transcurría el tiempo, a partir del tercer y quinto día de almacenamiento de los frutos de fresa coincidiendo con lo reportado en este estudio. En contraste, Salem *et al.*, 2021, reportaron que la acidez titulable disminuyó significativamente, independientemente de los tratamientos (ácido ascórbico más quitosan) a lo largo de 15 días de almacenamiento, tal disminución pudo deberse a los cambios metabólicos en los frutos o al consumo de ácidos orgánicos como fuente de sustrato durante el proceso de respiración.

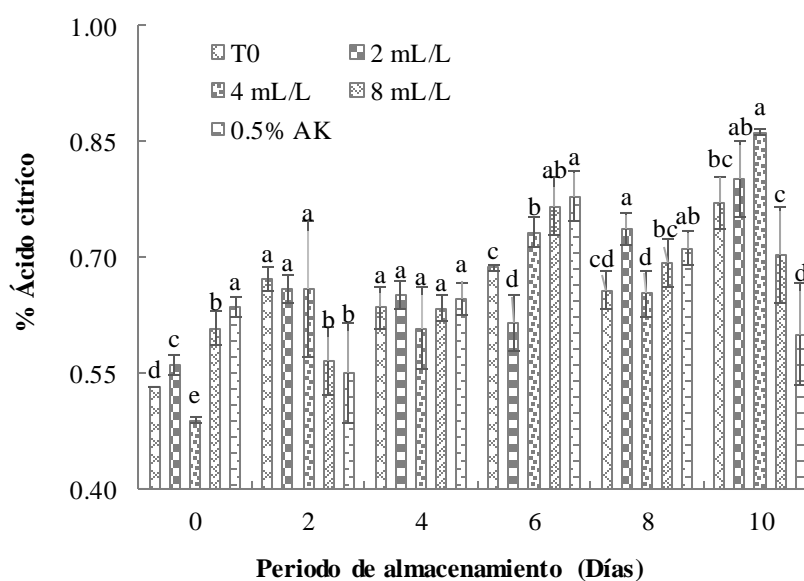


Figura 4. Diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en el porcentaje de ácido cítrico de los frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

Los sólidos solubles totales (SST) son parte de los atributos de calidad empleados para evaluar la madurez de la fruta (Zhang *et al.*, 2022), estos se expresan mediante °Brix. Para esta variable en el día 4 de almacenamiento los frutos del tratamiento 4 mL/L eak incrementaron en un 17% más que el T0 (Figura 5). Mientras que para el día 6, el tratamiento con menos °Brix fue el de 0.5% AK disminuyendo en un 16% comparado con T0. Y para los días posteriores no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos, siendo así la estabilidad de los °Brix. En un reciente estudio, se reporta que la aplicación de melatonina retrasa la maduración de los frutos de fresa disminuyendo los sólidos solubles totales al día 6 de almacenamiento (Promyuo *et al.*, 2023). En otro trabajo realizado por Liu *et al.*, 2018, observaron que no tuvieron diferencias significativas en el contenido de TSS entre frutas tratadas y no tratadas con melatonina durante los primeros 6 días de almacenamiento, mientras que en los días 9 y 12 solo el tratamiento con concentración más abaja ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) disminuyó significativamente el contenido de TSS. Se podría destacar que los frutos con la aplicación de 0.5% AK tuvieron un retraso en la maduración de frutos, por lo tanto, disminuyo el contenido de °Brix y tuvo el valor más alto en la firmeza al día seis de almacenamiento.

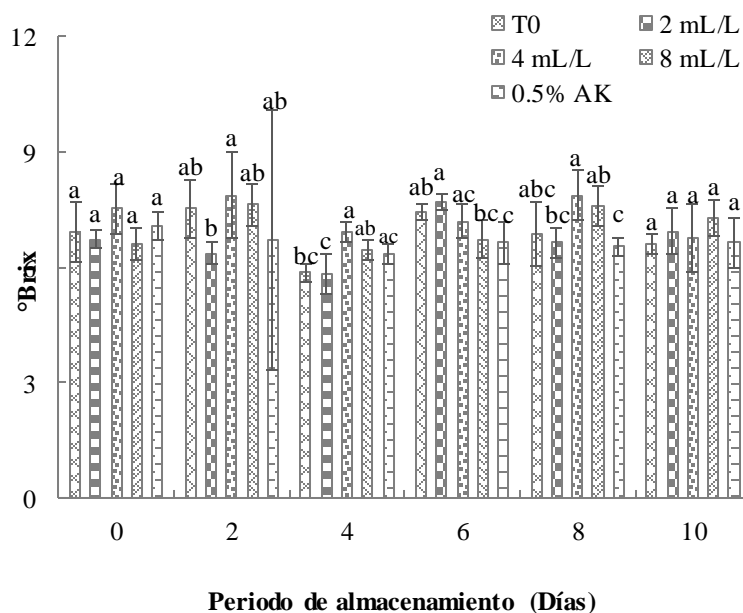


Figura 5. Diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en los sólidos solubles totales (°Brix) de los frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

Con respecto a la actividad de eliminación de radicales libres de DPPH se presentaron diferencias significativas en los diferentes días de almacenamiento (Figura 6). En el día 2 la actividad de eliminación de radicales libres de los frutos con los tratamientos 0.5% AK, 2 mL/L, 4 mL/L de eak fue en aumento en un 19%, 16%, 15% más que los frutos del T0. Mientras que al día 4, el tratamiento 4 mL/L de eak fue mayor en un 15% comparado con T0. Para el día 6, los frutos tratados con 2 mL/L, 8 mL/L y 4 mL/L de eak, fueron aumentando en un 12%, 10%, 6% comparados con T0. En el día 8 no se presentaron diferencias significativas, por otra parte, al día 10, solo el tratamiento 0.5% AK fue mayor que T0 en un 4%, y el tratamiento 4 mL/L de eak, tuvo menor actividad en un 10%.

Algunos autores como Sha H *et al.*, 2017, reportaron que con el uso de  $6 \text{ mmol}^{-1}$  de AK se mostró una mayor actividad de eliminación de radicales libres en frutos de litchi de 2.01 veces más después de 20 días de almacenamiento. El uso de otros compuestos como la aplicación de melatonina exógena aumento gradualmente y manteniendo valores altos en la actividad de eliminación de DPPH, y en el contenido de fenoles totales, optando por tener propiedades antisenesescencia (Wang *et al.*, 2022).

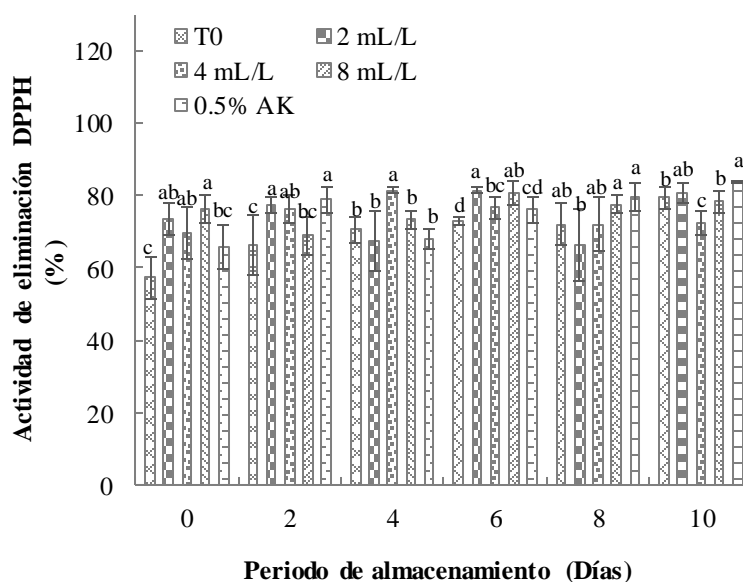


Figura 6. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial DPPH de frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

El contenido de fenoles totales se muestra en la Figura 7, presentándose diferencias significativas entre los días de almacenamiento. En la evaluación inicial, el contenido de

fenoles totales fue bajo, conforme avanzaron los días estos incrementaron de acuerdo a lo siguiente: en el día 2, los tratamientos 4 mL/L y 8 mL/L de eak aumentaron en un 30% y 18% comparado con T0. En el día 4, el incremento fue de 36%, 25%, 22% con los tratamientos 4 mL/L, 2 mL/L y 8 mL/L de eak comparados con T0. Para el día 6 solo fue para los tratamientos 8 mL/L y 4 mL/L aumentando en un 23% y 21% comparado con T0. Mientras que para el día 8, hubo una disminución de 18% con el tratamiento 2 mL/L comparado con T0. En el día 10, el tratamiento AK 0.5% tuvo un porcentaje de 25%, sin embargo, no fue diferente del T0. La aplicación de ácido kójico en concentración de 0.05 g/L incremento el contenido de fenoles totales durante los primeros cuatro días de almacenamiento de coles tiernas en comparación con el grupo control (Zeng *et al.*, 2021). Un aumento de fenoles totales en frutos podría ser un indicativo de que exista una mejoría de las propiedades nutraceuticas, en la investigación realizada por Petriccione *et al.*, 2015, mencionaron que al aplicar quitosano incremento el contenido de fenoles además de retrasar la senescencia de los frutos de fresa ayudo a mejorar el contenido fitoquimico durante el periodo de almacenamiento. En el presente estudio el incremento de fenoles totales solo fue para los días 2, 4 y 6 con la aplicación de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico.

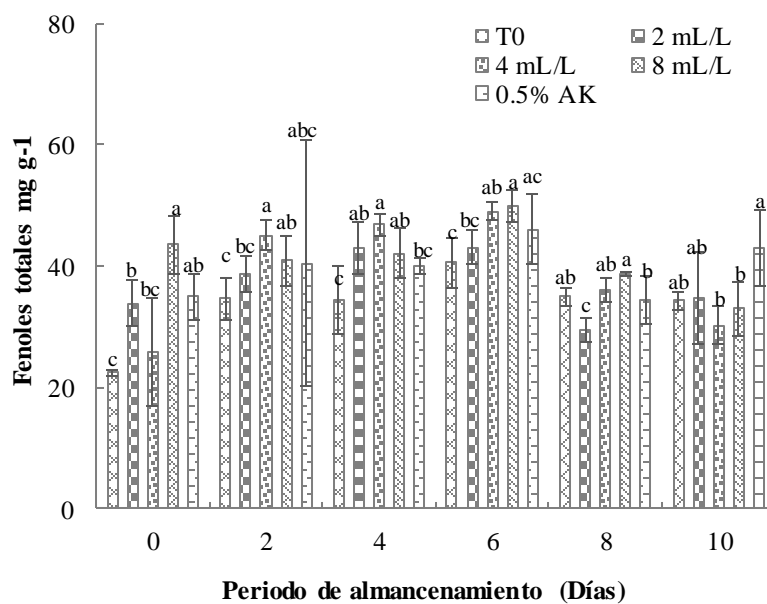


Figura 7. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en el contenido de fenoles totales de frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

El ácido ascórbico como antioxidante ayuda a eliminar los radicales libres, previniendo el deterioro de la fruta durante la maduración, debido a la oxidación (Rehman *et al.*, 2020). Respecto al contenido de vitamina C, los resultados se muestran en la Figura 8. Como se observa, en el día 2 el T0 control presento mayor contenido de vitamina c, mientras que los tratamientos 2 mL/L, 4 mL/L, y 8 mL/L eak fue menor en un 9%, 11%, y 14%. En el día 4 hubo un aumento de 27%, 24%, 17%, y 12%, en los tratamientos, 4 mL/L, 8 mL/L de eak, 0.5% AK, y 2 mL/Lde eak, comparados con T0. Los incrementos en el día 6, fueron para 4 mL/L de eak, 0.5% AK, y 8 mL/L de eak en un 20%, 14%, 7% comparados con T0. En el día 8, los tratamientos 2 mL/L, mL/L y 8 mL/L de eak incrementaron entre un 20 y 8% comparados con T0. Finalmente, para frutos que fueron almacenados por 10 días la vitamina C todos los tratamientos (0.50% AK, 4 mL/L, 2 mL/L y 8 mL/L de eak) aumentaron entre un 20% y 9% más que T0. En frutos de litchi la aplicación de 6 mmol L<sup>-1</sup> de AK incremento el contenido de ácido ascórbico 1.24 veces más que los frutos no tratados en el día 20 de almacenamiento (Sha H *et al.*, 2017), mientras que concentraciones más bajas de AK (2 mmol L<sup>-1</sup> y 4 mmol L<sup>-1</sup>) los resultados no fueron significativos. La vitamina C puede ser sensible a la degradación cuando el producto se somete bajo condiciones adversas de manipulación y almacenamiento sobre todo con temperaturas altas, humedad relativa baja, además daños físicos y daños generados por frío (Lee y Kader, 2000). Solo los frutos evaluados en el día 2 el contenido de vitamina C fue menor.

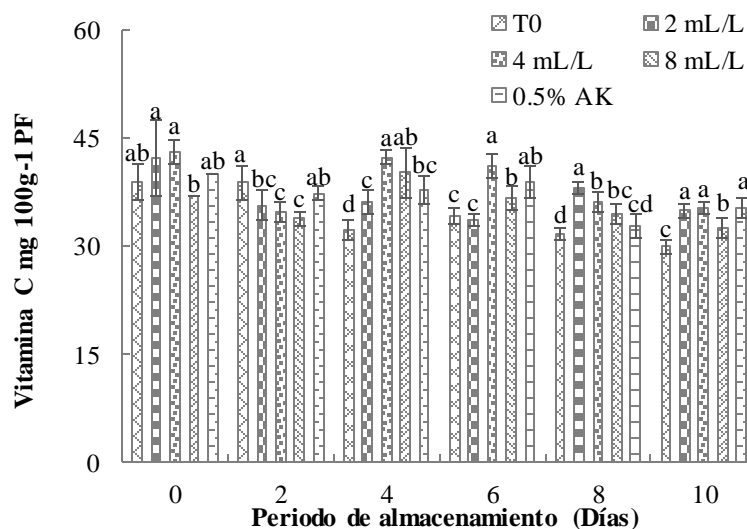


Figura 8. Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico y AK comercial en el contenido de vitamina C en frutos de fresa. Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

#### 4. CONCLUSIONES

El uso de un extracto de ácido kójico para ayudar a mejorar la calidad postcosecha en frutos de fresa influyo de manera positiva en las características fisicoquímicas de los frutos, así como en la capacidad antioxidante. Al igual que el extracto de ácido kójico, también el uso de AK comercial ayudo en la mejoría de algunos compuestos bioactivos. Tanto el extracto de ácido kójico como AK comercial, tuvieron efectos positivos en la firmeza de los frutos, al igual que en la pérdida de peso, así como en el índice de color, sin embargo, se debe resaltar que para estas variables solo las concentraciones 2 mL/L y 8 mL/L de eak , y 0.5% AK fueron superiores, mientras que el % de ácido cítrico, SST, la capacidad de eliminación de radicales libres DPPH, el contenido de fenoles totales y la vitamina C, todos los tratamientos influyeron de manera positiva al verse en aumento, por lo tanto, los frutos tuvieron una mayor capacidad antioxidante, y de manera positiva retraso el envejecimiento de los frutos aportando una mejora de apariencia y calidad nutracéutica.

#### Reconocimiento

Los autores agradecen el apoyo financiero de CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México) para la beca a la autora Tomasa Qúterio Gutiérrez, y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

**Declaraciones de los autores:** datos disponibles en el material complementario del artículo

#### 5. REFERENCIAS

- Azam, M., Ejaz, S., Rehman, R. N. U., Khan, M., Qadri, R., Azam, M., ... Qadri, R. (2019). Postharvest Quality Management of Strawberries. *Strawberry - Pre- and Post-Harvest Management Techniques for Higher Fruit Quality*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.82341>
- Bajpai, S., Shukla, P. S., Asiedu, S., Pruski, K., & Prithiviraj, B. (2019). A Biostimulant Preparation of Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum* Suppresses Powdery Mildew of Strawberry. *The Plant Pathology Journal*, 35(5), 406–416. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0066>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Chen, Y. H., Lu, P. J., Hulme, C., & Shaw, A. Y. (2013). Synthesis of kojic acid-derived copper-chelating apoptosis inducing agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2),



- 995–1003. <https://doi.org/10.1007/S00044-012-0094-Y>
- Colussi, R., Ferreira da Silva, W. M., Biduski, B., Mello El Halal, S. L., da Rosa Zavareze, E., & Guerra Dias, A. R. (2021). Postharvest quality and antioxidant activity extension of strawberry fruit using allyl isothiocyanate encapsulated by electrospun zein ultrafine fibers. *LWT*, *143*, 111087. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111087>
- El-Beltagi, H. S., Ali, M. R., Ramadan, K. M. A., Anwar, R., Shalaby, T. A., Rezk, A. A., ... El-Mogy, M. M. (2022). Exogenous Postharvest Application of Calcium Chloride and Salicylic Acid to Maintain the Quality of Broccoli Florets. *Plants 2022, Vol. 11, Page 1513, 11(11)*, 1513. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11111513>
- Galli, V., da Silva Messias, R., Perin, E. C., Borowski, J. M., Bamberg, A. L., & Rombaldi, C. V. (2016). Mild salt stress improves strawberry fruit quality. *LWT*, *73*, 693–699. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.07.001>
- Kim, J. H., & Chan, K. L. (2014). Augmenting the Antifungal Activity of an Oxidizing Agent with Kojic Acid: Control of Penicillium Strains Infecting Crops. *Molecules 2014, Vol. 19, Pages 18448-18464, 19(11)*, 18448–18464. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES191118448>
- Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, *20(3)*, 207–220. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00133-2)
- Liu, C., Zheng, H., Sheng, K., Liu, W., & Zheng, L. (2018). Effects of melatonin treatment on the postharvest quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *139*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2018.01.016>
- Mozafari, A., Dedejani, S., & Ghaderi, N. (2018). Positive responses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) explants to salicylic and iron nanoparticle application under salinity conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *134(2)*, 267–275. <https://doi.org/10.1007/S11240-018-1420-Y/FIGURES/3>
- Nazoori, F., Poraziz, S., Mirdehghan, S. H., Esmailzadeh, M., & Zamanibahramabadi, E. (2020). Improving Shelf Life of Strawberry Through Application of Sodium Alginate and Ascorbic Acid Coatings Introduction □. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *7(3)*, 279–293. <https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.297134.341>
- Packer, L. (2001). Vitamin C: From Molecular Actions to Optimum Intake, 136–165. <https://doi.org/10.1201/9780203904046-13>
- Peng, Z., Wang, G., He, Y., Wang, J. J., & Zhao, Y. (2023). Tyrosinase inhibitory mechanism and anti-browning properties of novel kojic acid derivatives bearing aromatic aldehyde moiety. *Current Research in Food Science*, *6*, 100421. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.100421>
- Petriccione, M., Mastrobuoni, F., Pasquariello, M. S., Zampella, L., Nobis, E., Capriolo, G., & Scortichini, M. (2015). Effect of Chitosan Coating on the Postharvest Quality and Antioxidant Enzyme System Response of Strawberry Fruit during Cold Storage.

- Foods* 2015, Vol. 4, Pages 501-523, 4(4), 501–523.  
<https://doi.org/10.3390/FOODS4040501>
- Promyou, S., Raruang, Y., & Chen, Z. Y. (2023). Melatonin Treatment of Strawberry Fruit during Storage Extends Its Post-Harvest Quality and Reduces Infection Caused by *Botrytis cinerea*. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 1445, 12(7), 1445.  
<https://doi.org/10.3390/FOODS12071445>
- Quiterio-Gutiérrez, T., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Hernández-Fuentes, A. D., Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., ... Juárez-Maldonado, A. (2019). The Application of Selenium and Copper Nanoparticles Modifies the Biochemical Responses of Tomato Plants under Stress by *Alternaria solani*. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 1950, 20(8), 1950.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS20081950>
- Rehman, M. A., Asi, M. R., Hameed, A., & Bourquin, L. D. (2020). Effect of Postharvest Application of Aloe Vera Gel on Shelf Life, Activities of Anti-Oxidative Enzymes, and Quality of ‘Gola’ Guava Fruit. *Foods*, 9(10).  
<https://doi.org/10.3390/FOODS9101361>
- Saeedi, M., Eslamifar, M., & Khezri, K. (2019, February 1). Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.006>
- Saleem, M. S., Anjum, M. A., Naz, S., Ali, S., Hussain, S., Azam, M., ... Ejaz, S. (2021). Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 160–169. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.051>
- Shah, H. M. S., Khan, A. S., & Ali, S. (2017). Pre-storage kojic acid application delays pericarp browning and maintains antioxidant activities of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 154–161.  
<https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2017.06.004>
- Taş, A., Berk, S. K., Orman, E., Gundogdu, M., Ercişli, S., Karatas, N., ... Mlcek, J. (2021). Influence of Pre-Harvest Gibberellic Acid and Post-Harvest 1-methyl Cyclopropane Treatments on Phenolic Compounds, Vitamin C and Organic Acid Contents during the Shelf Life of Strawberry Fruits. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 121, 10(1), 121. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10010121>
- Vignoni, L. A., M.césari, R., Forte, M., & Miráble, M. L. (2006). Determinación de Índice de Color en Ajo Picado. *Información Tecnológica*, 17(6), 63–67.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642006000600011>
- Wang, D., Randhawa, M. S., Azam, M., Liu, H., Ejaz, S., Ilahy, R., ... Wang, K. (2022). Exogenous melatonin treatment reduces postharvest senescence and maintains the quality of papaya fruit during cold storage. *Frontiers in Plant Science*, 13, 4965.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1039373/BIBTEX>
- Wang, S. Y., & Gao, H. (2013). Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x*

- aranassa Duch.). *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.05.003>
- Wang, Y.-X., Wang, S.-Y., Beta, T., Shahriar, M., Laborda, P., & Herrera-Balandrano, D. D. (2023). Kojic acid induces resistance against *Colletotrichum brevisporum* and enhances antioxidant properties of postharvest papaya. *Food Control*, 144, 109405. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2022.109405>
- Yan, J., Luo, Z., Ban, Z., Lu, H., Li, D., Yang, D., ... Li, L. (2019). The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 147, 29–38. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2018.09.002>
- Zeng, S., Zhao, X., Zuo, J., Yan, Z., Shi, J., Wang, Q., ... Sui, Y. (2021). Effect of Kojic Acid Treatment on Postharvest Browning of Baby Cabbages. *FOOD SCIENCE*, 42(17), 241. <https://doi.org/10.7506/SPKX1002-6630-20200602-034>
- Zhang, C., Li, W., Zhu, B., Chen, H., Chi, H., Li, L., ... Xue, J. (2018). The Quality Evaluation of Postharvest Strawberries Stored in Nano-Ag Packages at Refrigeration Temperature. *Polymers*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/POLYM10080894>
- Zhang, Y., Li, S., Deng, M., Gui, R., Liu, Y., Chen, X., ... Tang, H. (2022). Blue light combined with salicylic acid treatment maintained the postharvest quality of strawberry fruit during refrigerated storage. *Food Chemistry: X*, 15, 100384. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2022.100384>
- Zheng, T., Lv, J., Sadeghnezhad, E., Cheng, J., & Jia, H. (2022). Transcriptomic and metabolomic profiling of strawberry during postharvest cooling and heat storage. *Frontiers in Plant Science*, 13, 3913. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1009747/BIBTEX>
- Zhu, G. Y., Shi, X. C., Wang, S. Y., Wang, B., & Laborda, P. (2022). Antifungal Mechanism and Efficacy of Kojic Acid for the Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 13, 845698. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.845698/FULL>

**ARTÍCULO**

ESTUDIO DEL EFECTO BIOESTIMULANTE DE UN EXTRACTO DE ÁCIDO  
KÓJICO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN  
PLANTAS DE FRESA

## ESTUDIO DEL EFECTO BIOESTIMULANTE DE UN EXTRACTO DE ÁCIDO KÓJICO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE FRESA

Tomasa Quiterio-Gutiérrez<sup>1</sup>, Susana González-Morales<sup>2</sup>, José Antonio González Fuentes<sup>3</sup>, Adalberto Benavides –Mendoza<sup>3</sup>, Fabián Fernández-Luqueño<sup>4</sup> and Armando Robledo Olivo<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo COA 25315, México; [T.quiterio@hotmail.com](mailto:T.quiterio@hotmail.com)

<sup>2</sup> CONACyT- Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila 25315, Mexico; [qfb\\_sgm@hotmail.com](mailto:qfb_sgm@hotmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Horticultura; Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo COA 25315, México; [jagf252001@gmail.com](mailto:jagf252001@gmail.com) and [abenmen@gmail.com](mailto:abenmen@gmail.com)

<sup>4</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; [fabian.fernandez@cinvestav.edu.mx](mailto:fabian.fernandez@cinvestav.edu.mx)

<sup>5</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos; Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo COA 25315, México

\* Correspondencia: [armando.robledo@outlook.com](mailto:armando.robledo@outlook.com)

### RESUMEN

La categorización de los diferentes bioestimulantes, limita solo al uso de unos cuantos microorganismos benéficos como bacterias, micorrizas, y algunos hongos, además su aplicación se basa solamente en preparados que van directo al suelo o sustrato. El ácido kójico es un metabolito secundario cuyas características le permiten ser reconocido como agente quelante, antioxidante, antifúngico, antibacteriano, entre otros, sin embargo, su aplicación hasta ahora dentro del área de alimentos es para prevenir el pardeamiento de algunos frutos y verduras. Es por ello que se planteó la obtención de un extracto a base de ácido kójico, para lo cual se desarrolló el siguiente objetivo, que fue evaluar el efecto bioestimulante de un extracto de ácido kójico en la tolerancia al estrés por salinidad en plantas de fresa. Se evaluaron los cambios de la actividad enzimática y no enzimática, el

contenido de prolina, y la expresión de genes de defensa en hojas de fresa. La aplicación foliar del extracto de ácido kójico generó el aumento de la actividad de las enzimas SOD, APX, y GPX, además del aumento de PAL, tanto en condiciones sin estrés y con estrés salino, mientras que los compuestos no enzimáticos el contenido de fenoles totales y flavonoides totales, vitamina C, GSH, incrementaron en condiciones salinas, al igual que el contenido de clorofilas a, b y totales. También con la aplicación de eak el contenido de prolina aumentó con salinidad de 25 mM NaCl, y 40 mM NaCl. En la expresión de genes SOD, CAT, APX y PAL en condiciones salinas y no salinas con los tratamientos eak, AK (0.5%), el bioestimulante comercial aumentaron. La aplicación foliar del eak generó un efecto bioestimulante al aumentar los compuestos enzimáticos, no enzimáticos, además de la expresión de los genes de respuesta al estrés.

**Palabras clave:** metabolito secundario, estrés abiótico, *Fragaria × ananassa*, expresión de genes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fresa pertenece al género *Fragaria* de la familia *Rosaceae*, es un cultivo económicamente importante y ampliamente consumido en todo el mundo (Bian *et al.*, 2023). El estrés por salinidad puede tener un efecto negativo en el crecimiento, desarrollo, y la supervivencia de la planta al imponer estrés osmótico junto con desequilibrios iónicos y nutricionales (Avestan *et al.*, 2019). Algunos cultivos como el de fresa es considerado como cultivo sensible al estrés por la salinidad (Ghaderi *et al.*, 2018). Cuando existe un umbral de estrés elevado, la planta se estresa, seguida de la activación de mecanismos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, y a nivel molecular (Saharan *et al.*, 2022). Debido a estos efectos generados por el estrés salino, se toman medidas que ayuden a la tolerancia o mitigación del estrés, por medio del uso de bioestimulantes de plantas. Los bioestimulantes son productos que pueden actuar sobre procesos metabólicos y enzimáticos de las plantas mejorando la productividad y la calidad de los cultivos, así como también son implementados en cultivos que se encuentran bajo un estrés abiótico (Xu y Geelen, 2018). Aunque actualmente, no hay una definición legal o académica acordada de bioestimulante, existen diferentes definiciones (González-Morales *et al.*,

2021). De acuerdo a la definición publicada y más citada es la de du Jardin, 2015, que menciona que un bioestimulante vegetal, es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o las características de la calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes. Entre otras definiciones expuestas, se encuentra la descrita por la Unión Europea (EU, 2019), que refiere a un bioestimulante vegetal, como un producto fertilizante cuya función sea estimular los procesos de nutrición de las plantas independientemente del contenido de nutrientes del producto con el único objetivo de mejorar una o varias de las siguientes características de la planta o del medio rizosfera vegetal. El uso de la fermentación para obtención de productos de interés comercial, como le describe Calvo *et al.*, 2014, consiste en una pequeña cantidad de cepas microbianas que se fermentan o cultivan por separado, y posteriormente se eliminan del medio de fermentación, se concentran y se formulan con algún vehículo en la forma del producto final, dicho autor lo menciona como bioestimulante basados en inoculantes denominados microorganismos efectivos, entre los cuales destacan los hongos promotores de crecimiento vegetal (PGPF) (Babalola *et al.*, 2023), y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Bellotti *et al.*, 2022). El extracto obtenido por fermentación contiene algunos metabolitos específicos, algunos de ellos con actividad promotora de crecimiento (Vassileva *et al.*, 2021). Es de resaltar el interés por el microorganismo *Aspergillus niger*, que al igual que otros hongos, tiene gran importancia industrial, lo que le permite utilizarse en la fermentación industrial, por su capacidad metabólica en hidrólisis de carbohidratos y la producción de ácidos orgánicos como es el ácido cítrico (Lu *et al.*, 2022 :Xie *et al.*, 2018). Por lo cual, *A. niger*, es un hongo filamentoso que al estar presente en diferentes procesos industriales, diferentes compuestos obtenidos por la cepa, lo hacen ser reconocido como seguro (GRAS), por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ((Schuster *et al.*, 2002: Putri *et al.*, 2020), involucrándose también su uso en el área agrícola (Galeano *et al.*, 2021). Por otra parte, la producción de otro tipo de metabolito secundario, como es el ácido kójico, se obtiene de diversas especies del género *Aspergillus*, como *A. oryzae* como principal productor, usualmente este metabolito se ha empleado más como antioxidante, conservante de alimentos, como aditivo alimentario, para la prevención de la decoloración enzimática de

vegetales, como agente aclarante de la piel en preparaciones cosméticas (Chen *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2017). La aplicación de ácido kójico se ha implementado para evaluar la calidad postcosecha de algunos productos de fácil descomposición, como un antioxidante natural y prolongador de la vida de anaquel de diferentes productos alimenticios (Wang *et al.*, 2023), como por ejemplo, el brócoli, los cuales fueron sumergidos en combinación de AK+CaCl<sub>2</sub>, con resultados favorables al inhibir la degradación de clorofila, aumentando la actividad de enzimas (SOD, APX, CAT, POD), y regulando la expresión de genes implicados en la degradación de clorofilas (Yan *et al.*, 2020). Por las características reportadas de este metabolito, se produjo un extracto de ácido kójico por medio de fermentación líquida utilizando como inoculante una cepa de *Aspergillus niger* M4. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto bioestimulante de un extracto de ácido kójico en la tolerancia al estrés por salinidad, mediante las variables de respuesta, bioquímicas de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y molecular en hojas de fresa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Desarrollo del cultivo

Se trasplantaron plántulas de fresa con cepellón de la variedad frontera en bolsas de polietileno de 10 L el cual contenía como sustrato fibra de coco + peat moss (1:1 v/v) el desarrollo del cultivo fue bajo condiciones de invernadero en Saltillo, Coahuila México. La nutrición de las plantas fue mediante una solución Steiner, 1961 aplicada mediante un sistema de riego dirigido.

### 2.2 Aplicación de tratamientos y estrés por salinidad

Se aplicaron diferentes dosis de un extracto a base de ácido kójico obtenido por medio de fermentación de acuerdo a lo descrito por Quiterio-Gutiérrez *et al.*, 2023, las concentraciones fueron: 2 L/ha, 4 L/ha/ 8 L/ha (eak) vía foliar, un bioestimulante comercial (Phylgreen 250 mL por cada 100 L de agua), ácido kójico grado reactivo (0.5% Sigma Aldrich) y aplicación de solo agua (Testigo), aplicados 1 mes DDT y posteriormente cada semana durante todo el ciclo del cultivo. El estrés salino se indujo 8 semanas DDT con la aplicación de NaCl (Jalmek) a 10 mM, 25 mM, 40 mM y bajo



condiciones normales sin NaCl. Con una conductividad eléctrica de  $2.5 \text{ dS m}^{-1}$ ,  $4.5 \text{ dS m}^{-1}$ ,  $5.6 \text{ dS m}^{-1}$  y  $1.5 \text{ dS m}^{-1}$ , para cada nivel de salinidad, aplicándose un total de 24 tratamientos.

### 2.3 Muestreo para análisis enzimático y antioxidantes

Se colectaron muestras de hojas completamente desarrolladas 14 semanas DDT, se lavaron con agua destilada y posteriormente se almacenaron en un congelador a  $-20^\circ\text{C}$  y posteriormente se liofilizaron en un liofilizador (Labconco, FreeZone 2.5 modelo L, MO, EE. UU.) por 72h.

### 2.4 Muestreo para extracción de ARN

Se colectaron hojas de plantas de fresa en etapa de fructificación (15 DDT). Se colocaron en bolsas de aluminio y se sumergieron en  $\text{N}_2$  líquido en una hielera y posteriormente se llevaron a un Ultracongelador a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### 2.5 Procesamiento de muestras

Se realizó la extracción enzimática del tejido vegetal con buffer fosfatos, para esto en un tubo Eppendorf de 2 mL se colocaron 200 mg de tejido liofilizado más 20 mg de polivinilpirrolidona (Sigma Aldrich) y 1.5 mL de buffer fosfato a pH 7.2, después se sonicaron por 5 minutos, pasándose a centrifugar a 12500 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , se recolectó el sobrenadante y se filtró con una membrana nylon de  $0.45 \mu\text{m}$ , finalmente se realizó una dilución en una proporción 1:20 con buffer fosfato pH 7.2.

### 2.6 Determinación de proteínas totales y de actividad enzimática

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método colorimétrico de Bradford, 1976, en un tubo de vidrio se colocaron  $100 \mu\text{L}$  de extracto enzimático y  $1000 \mu\text{L}$  de reactivo Bradford, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leyeron a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). Las proteínas totales se expresaron en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco.

#### SOD (QE 1.15.1.1)

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se realizó mediante el kit comercial Cayman® 706002 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE. UU.). En una microplaca se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 200  $\mu\text{L}$  del detector radical más 20  $\mu\text{L}$  de solución xantina oxidasa, se cubrió la microplaca, y se incubó a 25°C por 30 minutos. Luego se midió la absorbancia a una longitud de 450 nm utilizando un lector de placas (BIOBASE, modelo BK-EL10C, No, 51 South Gongye Road, Jinan, China). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerida para exhibir una dismutación del 50% del radical superóxido. Los resultados se expresan en U por mililitro ( $\text{U mL}^{-1}$ ).

#### Catalasa (QE 1.11.1.6)

La actividad enzimática de catalasa se cuantificó por el método espectrofotométrico (Dhindsa *et al.*, 1981), midiendo dos tiempos de reacción, Tiempo 0 (T0) y Tiempo 1 (T1). Consistió para el T0, en un tubo de ensaye se añadió 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5% y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 mM, posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, modelo G10S, Waltham, MA, EE. UU.) a 270 nm con celdilla de cuarzo. Para el T1 se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 Mm, y se agito en vortex por 1 minuto, inmediatamente para detener la reacción se agregó 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5% y se midió la absorbancia con celda de cuarzo a 270 nm. Finalmente, los valores se expresan en U por proteínas totales, donde U es igual a mM equivalente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por mililitro por minuto.

#### Ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11)

La actividad de ascorbato peroxidasa se cuantificó por el método espectrofotométrico de acuerdo a lo establecido por Nakano y Asada, 1987, midiendo dos tiempos de reacción, Tiempo 0 (T0) y Tiempo 1 (T1). Consistió para el T0, en un tubo de ensaye se agregó 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 500  $\mu\text{L}$  de ascorbato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5% y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 Mm, posteriormente la absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA) a 266 nm con una celdilla de cuarzo. Para el T1, en un tubo de ensaye se agregó 100  $\mu\text{L}$  de extracto

enzimático, 500  $\mu\text{L}$  de ascorbato ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 100 Mm, se agito durante 1 minuto con un vortex, inmediatamente para detener la reacción se agregó 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5% y se midió la absorbancia a 266 nm con una celda de cuarzo. La actividad enzimática se expresó como U por proteínas totales, donde U es igual a  $\mu\text{mol QE}$  de ascorbato oxidado por mililitro por minuto.

#### Glutación peroxidasa (QE 1.11.1.9)

La enzima glutatión peroxidasa se determinó con el método modificado por Flohé y Günzler, 1984, y adaptado por (Xue *et al.*, 2001), utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. En un tubo de ensaye se agregaron y mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 400  $\mu\text{L}$  de glutatión reducido (0.1 mM), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.067M). Posteriormente se precalentó a  $25^\circ\text{C}$  por 5 minutos, después se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.3 mM) para iniciar la reacción catalítica, dejándose reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadió inmediatamente 1 mL de ácido tricloroacético al 1%. La mezcla se colocó en baño de hielo por 30 minutos, y enseguida se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Para la cuantificación de la enzima glutatión peroxidasa, en un tubo de ensaye se colocaron 480  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, 2.2 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.32M) más 320  $\mu\text{L}$  del colorante 5,5 dítio-bis-2 acido nitro benzoico (1 mM). Se leyó en espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA) a 412 nm. Los resultados se expresan en U por proteínas totales, donde U es igual al mM equivalente de GSH por mililitro por minuto.

#### Fenilalanina amonio liasa (QE 4.3.1.5)

La actividad de fenilalanina amonio liasa se determinó de acuerdo a lo descrito por (Sykłowska-Baranek *et al.*, 2012). En un tubo de ensayo se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y 900  $\mu\text{L}$  de L-Fenilalanina (6 mM). Posteriormente se incubo a  $40^\circ\text{C}$  por 30 minutos, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 250  $\mu\text{l}$  de ácido clorhídrico (HCl) 5 N. Las muestras se colocaron en un baño de hielo y se agregaron 5 mL de agua destilada. La absorbancia se determinó a 290 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). Los resultados fueron

expresados como U por proteínas totales, donde U es igual a  $\mu\text{mol}$  equivalente de ácido transcinámico por mililitro por minuto.

### 2.7 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante por ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid)) se determinó por el método espectrofotométrico de Re *et al.*, 1999, basándose en la decoloración del radical ABTS. Para la reacción del radical se preparó ABTS a 7 mM con persulfato de potasio a 2.45 mM (1:1), se dejó en oscuridad a 25°C por 16h, posteriormente se diluyó con etanol al 20% para obtener una absorbancia de  $0.700 \pm 0,02$  a 750 nm. Para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica, se colocó en una microplaca 5  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático obtenido con buffer fosfato pH 7.2 y 245  $\mu\text{L}$  de la dilución de radicales ABTS (7 mM), se agitó durante 5 s, y luego se dejó reposar durante 6 minutos en la oscuridad. La absorbancia se midió con un lector de placas (BIOBASE, modelo BK-EL10C, No, 51 South Gongye Road, Jinan, China) a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox en  $\mu\text{mol}$  por gramo de peso seco ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW).

Para la actividad DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) se realizó de acuerdo con (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se preparó una solución DPPH a 0.1 mM en 100 mL de metanol al 80%. La absorbancia de la solución se ajustó a  $0.700 \pm 0.02$  a 520 nm utilizando lector de placas (BIOBASE, modelo BK-EL10C, No, 51 South Gongye Road, Jinan, China). Para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica en una placa se agregó 6  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático y se añadió 234  $\mu\text{L}$  del radical DPPH. La disminución de la absorbancia se midió después de 30 minutos de reposo en oscuridad. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox en  $\mu\text{mol}$  por gramo de peso seco ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  DW).

### 2.8 Compuestos antioxidantes no enzimáticos

#### Fenoles totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron utilizando el método de Singleton *et al.*, 1999. El procedimiento consistió en realizar una extracción, en un tubo eppendorf de 2 mL se pesaron 200 mg de tejido liofilizado y se agregó 1 mL de solución agua: acetona (1:1), posteriormente se agitó en vortex por 30 segundos, para después colocarse en el

sonicador por 5 minutos. Los tubos se centrifugaron 12500 rpm por 10 min a 4°C. En un tubo de ensaye se agregaron 50 µL del sobrenadante, 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 500 de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, y se añadieron 5 mL de agua destilada, se agito en vortex por 30 segundos. Las muestras se pasaron a baño maría a 45°C durante 30 minutos. Después se tomó la lectura a 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg g<sup>-1</sup> PS).

#### Flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales se realizó mediante el método de (Arvouet-Grand *et al.*, 1994). En un tubo de ensaye se colocaron 100 mg de tejido liofilizado, y se agregaron 10 mL metanol grado reactivo (Jalmek), se homogenizo agitándose por 30 segundos en vortex. La mezcla se filtró con un filtro pirinola de 22 µm (Membrana Nylon 22 µm). Para la medición se agregaron 2 mL de extracto más 2 mL de solución metanólica de tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 2% en un tubo de ensayo, y se dejó reposar por 20 minutos en oscuridad. Posteriormente se tomó la lectura en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA) a 415 nm. El contenido de flavonoides se expresó en miligramos equivalentes de quercentina por gramo de peso seco (mg g<sup>-1</sup> PS).

#### Glutación reducido

Para la medición de glutatión se realizó mediante la técnica espectrofotométrica de (Xue *et al.*, 2001), por medio de la reacción del ácido 5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoico (DTNB-Sigma Aldrich). Se agregaron 480 ul de extracto, 2.2 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0.32 M, 320 µL del colorante DTNB (1mM) en un tubo de ensayo, posteriormente se agito por 10 segundos en vortex, y se leyó a 412 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron en mmol equivalentes de GSH mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> proteína total<sup>-1</sup> (mmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> TP).

## Vitamina C

El contenido de vitamina C se determinó por el método de titulación con 2,6 diclorofenolindofenol (Packer, 2001). Se pesó 1 gramo de hoja, posteriormente se maceraron en un mortero de porcelana con 10 mL de HCl al 2%, se homogenizo perfectamente, posteriormente se filtró a través de una gasa absorbente estéril sobre un matraz aforación, y después se aforo a 100 mL con agua destilada. Se tomó una alícuota de 10 mL del filtrado y se tituló con 2-6 diclorofenolindofenol hasta obtener una coloración rosácea persistente. El contenido de vitamina C se expresa en  $\text{mg}^{-1} 100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco.

## 2.9 Aminoácidos

### Prolina

El contenido de prolina se determinó por el método descrito por Bates *et al.*, 1973 En un tubo de ensaye se colocaron 200 mg de tejido liofilizado y 2 mL de solución extractora de ácido sulfosalicílico 3% (p/v), se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos a 25°C. En un tubo de vidrio envuelto en aluminio se agregaron 1 mL de sobrenadante, 1 mL de ninhidrina (0.1 M), y 1 mL de ácido acético glacial tibio. Se agitaron en vortex por 20 segundos y se calentaron a ebullición por 1h. Se enfriaron las muestras en baño de hielo, y se dejaron reposar por 15 minutos. Posteriormente se agregaron 3 mL de tolueno y se agitaron en vortex por 1 minuto. Se colecto la fase superior y se leyó una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, model G10S, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol g}^{-1}$  peso seco.

### 2.9.1 Clorofilas

El contenido de clorofilas se midió por el método modificado por (Munira *et al.*, 2015). En un mortero de porcelana se molieron 1 gramo de hoja fresca, se adicionaron 5 mL de acetona (90%), y 10 mg de carbonato de magnesio se re-homogenizo la mezcla, después se tomaron 2 mL del homogen y se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL, y se centrifugo por 5 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se leyó las absorbancias a y b a 663 nm y 645 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific,

modelo G10S, Waltham, MA, EE. UU). El contenido de clorofila total se expresó como  $\mu\text{g g}^{-1}$ , y se determinó mediante las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}\text{Clorofila a } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) &= 25.38\cdot\text{A663} + 3.64\cdot\text{A645} \\ \text{Clorofila b } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) &= 30.38\cdot\text{A645} - 6.58\cdot\text{A663} \\ \text{Clorofila total } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) &= 18.8\cdot\text{A663} + 34.02\cdot\text{A645}\end{aligned}$$

### 2.9.2 Contenido de minerales

La digestión ácida consistió en colocar 1 gramo de material seco en un vaso de precipitado de 100 mL, posteriormente se agregaron 30 mL de ácido nítrico, se colocó un vidrio de reloj y los vasos se llevaron a una parrilla de calentamiento por 3 h hasta la clarificación de la muestra. Se dejó enfriar la muestra y se filtró en papel filtro Whatman No. 42, después se aforo en un matraz volumétrico de 50 mL con agua desionizada (AOAC, 1990). Se determinó con un espectro de emisión por plasma (PERKIN ELMER Modelo OPTIMA 8300). Los resultados de los macroelementos se informaron en % (g elemento/100 g de tejido vegetal) y los microelementos en ppm (mg elemento/kg de tejido vegetal).

### 2.9.3 PCR de transcripción inversa en tiempo real

#### Procesamiento de muestra

Se implementó el método descrito por Pillet *et al.*, 2017, al cual se le realizaron algunas modificaciones en periodos de agitación y precipitación, mismo que resulto efectivo para la extracción de ARN de hojas de plantas de fresa sometidas a estrés salino. Se maceraron las hojas de fresa en un mortero frío y se le añadió  $\text{N}_2$  líquido, se macero hasta que quedo un polvo fino. Se pesaron 250 mg de tejido macerado en tubos de 2 mL y se colocó sobre una gradilla criogénica y se le añadieron 650  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción (CTAB al 2%, PVP al 2%, Tris 100 mM, EDTA 25 Mm, NaCl a 2M,  $\beta$ -Mercaptoetanol al 2%), después con un micromortero estéril se homogenizo bien la muestra por 20 segundos, para después agitarse en vortex por 20 segundos. La muestra se incubo a  $65^\circ\text{C}$  por 10 minutos, para después añadirse cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex por 1 minuto hasta tener un aspecto lechoso, se centrifugaron las muestras a 13500 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos para la separación de las fases. Después se colecto 400  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa y se coloca en un tubo nuevo de 2 mL previamente enfriado y se agrega 625  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agita por 10 segundos en vortex, y después se centrifugo a 13500 rpm a  $4^\circ\text{C}$  por 15 minutos para una segunda separación de fases. Se tomaron 400

$\mu$ L de sobrenadante y se añadió en un tubo de 2 mL y se añadieron 400  $\mu$ L de LiCl volumen (1:1), y se dejó reposar toda la noche a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13500 rpm a 4°C por 30 minutos para precipitar el ARN, y el sobrenadante se desechó. Con una puntilla con filtro agregar 500  $\mu$ L de tampón SSTE (NaCl a 1M, SDS al 0.5%, Tris 10 mM, y EDTA 1 mM), se agitó en vortex por 5 segundos, y después se centrifugo a 13500 rpm a 4°C por 30 minutos. Se removió el sobrenadante con cuidado de no desechar el pellet formado, y se agregó 1000  $\mu$ L de etanol al 75%, se agito en vortex por 10 segundos, y se volvió a centrifugar con las especificaciones descritas anteriormente. Finalmente se eliminó el sobrenadante con cuidado y se dejó secar por 15 minutos, para después agregar 15  $\mu$ L de agua inyectable y después de 5 minutos almacenar a -80°C en un ultracongelador. El ARN extraído fue tratado con DNase I (Sigma Aldrich, Burlington, MA, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor, y la cuantificación usando un espectrofotómetro UV-Vis  $A_{260}/A_{280}$  nm, y la calidad fue determinada por desnaturalización de electroforesis. Para la síntesis de cDNA se realizó utilizando un kit comercial Bioline (BIO-65053, SensiFAST cDNA Synthesis Kit), de acuerdo a las especificaciones. Los cebadores actuaban como un gen endógeno (ACT), y cuatro genes de estudio: Superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato peroxidasa (APX), Catalasa (CAT), Fenilalanina amonio liasa (PAL). El gen endógeno ACT, y gen de estudio PAL se obtuvo de Xu *et al.*, 2019, las demás secuencias de los cebadores SOD, APX y CAT fueron obtenidas de Zhang *et al.*, 2020, y se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuenciación de cebadores de los genes analizados

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ACT	GGGATGACATGGAGAAGATTTGGC	TCTCACGATTAGCCTTGGGATTCAG
SOD	CGTGGACTGCAGACGTTCTC	CTGCTCGAGAGCCTTGT
APX	TCCTCACCACCACCGGTATT	GCCTTGGTCCACTTGCTGTA
CAT	TGGAGTGCAGACACCTGTCAT	GGACCATGTCCGGGAATTTCA
PAL	GAAGGACTTGCTTTGGTGAATG	GATCTCGGAAAGAACAGCTAGAG

Las PCR en tiempo real se realizaron en Applied Biosystems StepOne™ Equipment versión 2.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) usando el método  $\Delta\Delta C_t$ , midiendo la intensidad de fluorescencia de SYBR™ Select Master Mix (Applied



Biosystems, Foster City, CA, EE. UU). La PCR se realizó en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  para todos los genes (10  $\mu\text{L}$  Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA, la concentración de cebadores y agua libre de nucleasas). Para el gen actina, la concentración del cebador directo fue de 100 nM. Para los genes APX, CAT, PAL, la concentración de los cebadores fue de 100 nM. Para SOD fue de 200 nM. La PCR en tiempo real se ejecutó en las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C y PCR (40 ciclos): 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

### 2.9.2. Análisis Estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial (4 $\times$ 6), totalizando 24 tratamientos. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher ( $p < 0.05$ ). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat (2020). Los mapas de calor para la expresión génica se generaron en el software estadístico GraphPad Prism 8.

## 3. RESULTADOS

### Actividad enzimática en hojas de fresa

Con respecto a la actividad enzimática de hojas de fresa cultivadas en condiciones normales y con los distintos niveles de salinidad aplicada con los diferentes tratamientos se presentaron diferencias significativas en las enzimas, SOD, CAT, APX, GPX y PAL (Tabla 1). En condiciones normales la actividad de SOD incrementó en el tratamiento 8 L/ha eak en un 98% comparado con el testigo (T0). Y en condiciones de estrés salino, a concentración de 10 mM NaCl el tratamiento 2 L/ha eak aumento en un 132% comparado con plantas control. Con 25 mM NaCl el aumento fue de 250% y 211% para los tratamientos 2 L/ha eak y Phylgreen respectivamente, comparados con su control. Mientras que con 40 mM NaCl los aumentos fueron solamente para el tratamiento 2 L/ha y 4 L/ha eak con un 65% y 67% respectivamente, comparado las plantas control. Referente a la actividad enzimática de catalasa, en condiciones no salinas solamente con el tratamiento AK (0.5%) incrementó en un 84% comparado plantas control T0. Con 10 mM NaCl no se presentaron diferencias entre tratamientos, y con 25 mM NaCl todos los tratamientos disminuyeron la actividad de catalasa en un 175%, 76%, 165%, y 63%

comparados con plantas control (2 L/ha, 4 L/ha, y 8 L/ha de eak, AK (0.5%)), siendo la aplicación del bioestimulante comercial Phylgreen el que disminuyó más en un 365% comparado con el control. Con 40 mM NaCl solo el tratamiento AK (0.5%) aumentó en un 215% más que el control. Para la enzima APX sin estrés salino la actividad incrementó en un 146% y 203% con los tratamientos 8 L/ha eak y AK (0.5%) comparados T0. Mientras que con 10 mM NaCl la mayor actividad enzimática fue para el tratamiento 2 L/ha eak aumentando con un 530% comparado con plantas control. Con 25 mM NaCl el aumento fue para 4 L/ha eak en un 202% comparado con plantas control. Con 40 mM NaCl el aumento fue de 120% y 85% comparado con plantas control en los tratamientos 4 L/ha eak y Phylgreen. En condiciones sin salinidad las aplicaciones de los tratamientos no tuvieron efecto sobre la actividad de GPX. Mientras que con 10 mM NaCl la actividad de GPX, con la aplicación del tratamiento 2 L/ha eak aumentó en un 49% comparado con plantas control. Con 25 mM NaCl el aumento fue en los tratamientos 2 L/ha y 8 L/ha eak, en un 129% y 50% más que las plantas control. Con 40 mM NaCl solamente en el tratamiento 8 L/ha disminuyó la actividad de GPX con un 98% comparado con plantas control. En la actividad de PAL en condiciones sin estrés por salinidad, solo el tratamiento de AK (0.5%) incrementó en un 68% comparado con el testigo (T0). Mientras que con 10 Mm NaCl no se presentaron diferencias entre los tratamientos, sin embargo, hay un aumento de la actividad de PAL con el tratamiento 2 L/ha eak con un 52% comparado con el testigo (T0). Con 25 mM NaCl la aplicación del extracto de ácido kójico en las diferentes concentraciones (2 L/ha, 4 L/ha y 8 L/ha) aumentó en un 107%, 57% y 53% comparados con plantas control. En 40 mM NaCl solo la aplicación de 8 L/ha eak disminuyó en un 122% comparado con las plantas control. Respecto al contenido de proteínas totales, en condiciones sin salinidad los tratamientos no tuvieron efecto en las proteínas totales, y en condiciones de salinidad con 10 mM NaCl las proteínas disminuyeron con un 62% en el tratamiento 2 L/ha eak comparados con plantas control. Con 25 mM NaCl, el tratamiento 2 L/ha eak disminuyó con un 78% comparado con plantas control, mientras que el tratamiento AK (0.5%) aumentó con un 28% comparado con plantas control. Con 40 mM NaCl solamente en el tratamiento 8 L/ha eak aumentó con un 110% comparado con las plantas control.

Tabla 1. Actividad enzimática y contenido de proteínas totales en hojas de fresa bajo estrés salino.

Tratamientos	SOD U mL <sup>-1</sup>	CAT U g <sup>-1</sup> PT	APX U g <sup>-1</sup> PT	GPX U g <sup>-1</sup> PT	PAL U g <sup>-1</sup> PT	Proteínas mg g <sup>-1</sup>
T0	5.52±0.52e-h	10.03±4.35 c-f	3.03±1.13 e-h	13.43±2.17 fi	1.00±0.13 e-h	9.97±1.22c-g
2L/ha	6.36±3.15e-h	8.67±6.07 c-f	6.23±2.63 c-g	15.61±6.25 d-h	1.20±0.56 b-h	8.78±1.67d-i
4L/ha	5.84±3.19e-h	6.66±3.17 d-f	2.67±1.10 fgh	14.33±2.65 e-i	1.23±0.19 b-h	9.15±1.48 d-h
8L/ha	10.97±4.34a-d	9.71±2.56 c-f	7.48±2.14 cd	18.14±3.66 b-f	1.30±0.31 b-g	8.24±2.54 d-i
Phylgreen	3.7±1.91 h	7.63±5.99 cf	4.43±1.05 d-h	13.72±1.42 f-i	1.12±0.25 c-h	10.49±3.20 b-f
AK (0.5%)	7.92±1.99 d-g	18.45±3.00 ab	9.21±3.67 bc	16.49±5.97c-g	1.68± 0.88 ab	7.72±4.11 d-i
10 mM NaCl	5.29±2.53 e-h	6.9±6.55 d-f	2.36±0.35 gh	14.15±3.29 f-j	1.04±0.13 d-h	8.89±1.51 d-i
10NaCl+2L/ha	12.31±6.07 abc	5.09±3.88f	14.99±7.04 a	21.11±1.48 bc	1.52± 0.17 bcd	5.47±1.53 i
10 NaCl+4L/ha	9.08±2.39 cf	4.52± 2.51 f	2.52±1.29 fgh	18.95±1.27 b-f	1.46±0.30 b-e	6.83±1.27 ghi
10NaCl+8L/ha	4.25±1.36 gh	7.14± 4.75 d-f	1.77±0.35 h	15.95±10.58 c-h	0.92±0.40 fgh	11.14±4.32 bcd
Phylgreen	5.51±1.88 e-h	6.02±3.60 ef	1.63±0.61 h	14.33±3.96 e-i	1.1±0.45 c-h	10.91±3.51 bcd
AK (0.5%)	5.7±1.02 e-h	9.84±2.47 c-f	1.94± 0.57 h	15.58±1.22 d-h	1.16±0.16 c-h	10.06±1.09 c-g
25 mM NaCl	3.83±0.80 g-h	23.62±7.43 a	2.43±1.47 fgh	12.64±1.59 ghi	1.04±0.13 d-h	10.63±1.35 c-e
25NaCl+2L/ha	13.43±2.94 ab	8.57±3.38 c-f	2.93±0.72e-h	28.99±0.64 a	2.16±0.48 a	5.94±1.19 hi
25NaCl+4L/ha	6.63±3.47 e-h	13.41±5.30bcd	7.35±10.43cde	14.09±1.99 f-i	1.63±1.01 bc	9.22±2.98 d-h
25NaCl+8L/ha	9.31±3.41b-e	8.89±4.82 c-f	1.73±1.17 h	18.98±4.60 b-f	1.60±0.60 bc	6.71±2.46 ghi
Phylgreen	11.92±4.76 a-d	5.07± 2 f	1.25±0.29h	11.97±2.89 ghi	1.02±0.25 d-h	12.76±3.79 abc
AK (0.5%)	5.3±1.42 e-h	14.49±9.10 bc	3.17±3.00 e-h	10.93±1.64 hi	0.88±0.20 gh	13.65±3.07 ab
40 mM NaCl	8.89±3.05 c-f	5.89±1.91 ef	6.88±1.01 c-f	18.79±4.21 b-f	1.56±0.34 bc	7.04±2.23 f-i
40NaCl+2L/ha	14.7±3.40 a	11.7±2.05 b-f	10.2±2.73 bc	19.75±1.21 bcd	1.5±0.26 b-e	6.65±1.36 ghi
40NaCl+4L/ha	14.93±3.61 a	12.57±2.22b-e	15.14±2.16 a	19.53±4.07 b-e	1.34±0.23 b-g	6.06±1.24 hi
40NaCl+8L/ha	4.92±2.08 fgh	6.18± 4.40 ef	6.21±1.91c-g	9.48±2.25 i	0.70±0.10 h	14.8±3.19 a
Phylgreen	10.92±1.75 a-d	5.66± 2.76 ef	12.73±1.67 ab	14.7±1.42d-i	1.16±0.12 c-h	7.37± 0.25 e-i
AK (0.5%)	12.62±3.75 abc	18.56±12.52ab	8.91±4.65 bc	22.89±4.04 b	1.42± 0.39 b-f	6.97±2.88 ghi

SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, GPX: glutatión peroxidasa, PAL: Fenilalanina amonio liasa, T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

### **Compuestos antioxidantes en hojas de fresa**

Los compuestos antioxidantes no enzimáticos evaluados en hojas de plantas de fresa bajo condiciones de estrés salino presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 2). El contenido de fenoles totales en ausencia de estrés salino no se vio afectado. Con 10 mM NaCl los fenoles incrementaron en un 16% con el tratamiento 4 L/ha eak comparado con plantas control. Mientras que con 25 mM NaCl los tratamientos 4 L/ha eak, Phylgreen y AK (0.5%) aumentaron con un 20%, 17% y 16% respectivamente comparado con plantas control. Con 40 mM NaCl con la aplicación de 4 L/ha eak, y AK (0.5%) hubo un incremento de 17% comparado con plantas control. En el contenido de flavonoides hubo una disminución del 19% y 21% en los tratamientos 8 L/ha y AK (0.5%) comparados con el testigo (T0), en condiciones sin estrés. Con 10 mM NaCl hubo aumentos del 28%, 29% y 27% en los tratamientos 2L/ha, 4 L/ha y 8 L/ha eak comparados con plantas control. Por otra parte, con 25 mM NaCl solo el tratamiento AK (0.5%) aumentó el contenido de flavonoides en un 14% comparado con plantas control. A 40 mM NaCl el incremento fue de 19% y 17% más que las plantas control con la aplicación de los tratamientos 4 L/ha y 8 L/ha eak. En el contenido de vitamina C en hojas sin estrés salino se presentó una disminución del 24%, 21%, y 23% con los tratamientos 4 L/ha, 8 L/ha, y Phylgreen comparados con el testigo (T0). Con 10 mM NaCl el tratamiento 2 L/ha eak disminuyó en un 59% comparado con plantas control, mientras que en los tratamientos 4 L/ha, 8 L/ha y AK (0.5%) incrementaron con un 37%, 25%, y 21% respectivamente comparados con plantas control. Con 25 mM NaCl el tratamiento Phylgreen aumentó en un 29% comparado con plantas control, y a 40 mM NaCl el aumento solo fue con el tratamiento AK (0.5%) en un 26% comparado con plantas control. Para GSH en condiciones no salinas solo con la aplicación de 4 L/ha eak aumentó en un 18% comparado con el testigo (T0). Con 10 mM NaCl el aumento fue con la aplicación de AK (0.5%) con un 15% comparado con plantas control. Por otra parte, con 25 mM NaCl no hubo diferencia entre los tratamientos, y con 40 mM NaCl en el tratamiento 4 L/ha eak disminuye GSH en un 24% comparado con plantas control. En la capacidad antioxidante ABTS, la aplicación de los tratamientos en condiciones no salinas, solamente se presentó efecto con el tratamiento 2 L/ha eak disminuyendo en un 39% comparado con el testigo (T0). De igual manera a 10 mM NaCl la capacidad antioxidante disminuyó en un 37% y

28% comparado con plantas control, en los tratamientos 2 L/ha eak y Phylgreen. Para 25 mM NaCl solamente la aplicación de Phylgreen incrementó con un 19% comparado con plantas control. Mientras que con 40 mM NaCl los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha, Phylgreen y AK (0.5%) disminuyeron entre 27% y 30% comparados con plantas control. En la capacidad antioxidante DPPH, en ausencia de estrés salino los tratamientos 4 L/ha y Phylgreen incrementaron con un 19% y 20% comparado con el testigo (T0). Mientras que con 10 mM NaCl no se presentaron diferencias entre sus tratamientos, ni con el testigo (T0). Por otra parte, con 25 mM NaCl se observaron incrementos de entre 23% y 26% con los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha eak, Phylgreen y AK (0.5%), comparados con plantas control. Con 40 mM NaCl, los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha, Phylgreen y AK (0.5%) disminuyeron. Por lo que, conforme había más salinidad la capacidad antioxidante se veía más afectada en conjunto con la aplicación de los tratamientos, misma tendencia se mostró en ABTS bajo condiciones salinas altas.

Tabla 2. Compuestos antioxidantes en hojas de fresa de plantas con estrés salino

Tratamiento	Fenoles mg g <sup>-1</sup> PS	Flavonoides mg g <sup>-1</sup> PS	GSH mmol 100 g <sup>-1</sup>	VC mg 100g <sup>-1</sup> PF)	ABTS μmol TE /·g <sup>-1</sup>	DPPH μmol TE /·g <sup>-1</sup>
T0	54.84±1.91 d-i	31.34±3.82 ab	1.34±0.17 c-i	44.44±0.88 a	156.68±14.49 di	156.65±11.95 e-h
2L/ha	52.14±7.86 ghi	30.92±3.33 abc	1.43±0.20 b-g	44±2.64a	112.32±37.04j	157.24±41.03 e-h
4L/ha	58.69±3.19b-g	31.3±1.40 abc	1.58±0.23 ab	35.64±3.01 de	160.41±13.84 c-h	187.1±24.61 a-d
8L/ha	60.31±6.40 a-d	26.17±2.01ei	1.29±0.10 f-j	36.52±0.88 cd	144.09±18.03 ghi	161.77±27.39 c-h
Phylgreen	58.44±4.89 b-g	31.6±2.05 a	1.44±0.26 b-f	36.08±8.44 d	168.06±26.81 b-g	188.6±37.55 a-d
AK (0.5%)	53.51± 2.57 e-i	25.94±3.33 f-j	1.5±0.03 abc	43.56±1.69 ab	156.06±18.93 d-i	179.82±18.49 a-f
10 mM NaCl	54.39±4.48 d-i	22.32±1.59 kl	1.43±0.21 b-g	29.48±2.21 fg	183.75±30.16 a-d	161.44±15.77 c-h
10 NaCl+2L/ha	50.26±1.94 i	28.71±2.79b-f	1.48±0.15 a-e	18.48±1.76 i	133.29±28.44 hij	164.69±15.31 b-h
10 NaCl+4L/ha	62.99±2.87 abc	28.84±2.39 a-e	1.23±0.09 hij	40.48±5.1abc	156.18±36.28 d-i	153.72±19.82 e-i
10 NaCl+8L/ha	60.09±5.89 a-e	28.5±2.09c-f	1.51±0.12 abc	36.9±4.19 bcd	180.65±26.46 a-e	160.13±29.71 d-h
Phylgreen	57.14±9.70 c-h	24.61±2.58 g-k	1.34±0.11 c-i	29.92±2.4fg	143.01±16.68 ghi	149.76±10.26 f-i
AK (0.5%)	59.14±9.50 a-f	22.63±0.85 kl	1.65±0.07 a	35.86±3.89 d	168.31±11.90 b-g	180.2±15.71 a-f
25 mM NaCl	54.71±420 d-i	25.9±1.80 f-j	1.31±0.07 d-j	24.2±0.88 h	173.79±27.04 b-f	154.03±12.32 e-i
25 NaCl+2L/ha	51.09±0.85 hi	28.03±1.95 def	1.49±0.04 a-d	29.48±4.63 fg	189.77±24.31 ab	193.09±29.86 ab
25 NaCl+4L/ha	65.54±4.61 a	27.02±2.17 d-h	1.47±0.10 a-f	26.4±1.44 gh	180.37±26.93 a-e	189.99±22.12 abc
25 NaCl+8L/ha	57.74±2.63 b-h	27.38±0.45 d-g	1.17±0.09 ij	26.4±1.44 gh	147.32±14.60 f-i	148.37±27.98 ghi
Phylgreen	64.04±4.94 ab	27.25±0.87 d-h	1.43±0.08 b-g	31.24±0.88f	206.38±3.67 a	194.8±21.61 a
AK (0.5%)	63.29±2.79 abc	29.61±1.53 a-d	1.41±0.08 b-h	26.84±2.64gh	184.75±17.31 abc	189.6±23.79 a-d
40 mM NaCl	53.41±3.85 ei	20.5± 0.98 l	1.4±0.02 b-h	25.08±0.88 h	169.54±13.70 b-g	181.64±17.98 a-e
40 NaCl+2L/ha	58.31±0.76 b-g	23.25±2.48 jkl	1.25±0.11 g-j	25.08±0.88 h	133.29±11.47 hij	126.83±15.07 i
40 NaCl+4L/ha	62.36±3.28 abc	24.48±1.81 h-k	1.13±0.07 j	25.96±0.88 gh	136.81±9.56 hij	145.63±6.08 ghi
40 NaCl+8L/ha	54.91±5.73 d-i	24.09±2.16 ijk	1.4±0.20 b-h	16.28±0.88 i	153.61±36.88 e-i	171.51±41.93 a-g
Phylgreen	53.21±4.47 f-i	20.5±1.17 l	1.3±0.11 e-j	23.32±2.21 h	129.75±7.93 ij	150.87±10.73 f-i
AK (0.5%)	62.69±0.85 abc	23.25±0.51 jkl	1.33±0.07 c-i	31.68±2.89 ef	129.04±10.56 ij	140.75±16.03 hi

GSH: glutatión reducido, VC: vitamina c, ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, PS) peso seco, PF: peso fresco, T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

### **Pigmentos fotosintéticos**

Los contenidos de clorofila a, b y totales en hojas de plantas sometidas a diferentes niveles de estrés por salinidad presentaron diferencias significativas en algunos tratamientos (Tabla 3). En ausencia de salinidad el contenido de clorofila a disminuyó con la aplicación de AK (0.5%) en un 25% comparado con el testigo (T0). Con 10 mM NaCl los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha, y 8 L/ha eak aumentaron con un 130 %, 43 %, y 25 % comparado con plantas control, y con 25 mM NaCl no se presentaron diferencias entre los tratamientos, pero si hubo una disminución de clorofila a comparada con el testigo (T0). Mientras que con 40 mM NaCl, el incremento fue para la aplicación del tratamiento 4 L/ha eak en un 37% comparado con plantas control. En clorofila b, la aplicación de los tratamientos en condiciones sin estrés no modificaron este pigmento, mientras que con 10 mM NaCl con la aplicación de los tratamientos 2 L/ha y 4 L/ha eak, aumentaron con un 162% y 36% comparado con plantas control. Con 25 mM NaCl no se tuvieron efectos en la clorofila b entre los tratamientos, sin embargo, hay una disminución de todos los tratamientos comprando con el testigo (T0). Con 40 mM NaCl el aumento fue de 43% comparado con plantas control con el tratamiento 4 L/ha eak. Las clorofilas totales disminuyeron en condiciones normales solamente con la aplicación de AK (0.5%) con un 25% comparado con el testigo (T0). En 10 mM NaCl el aumento fue de 131%, 43%, y 25% más que las plantas control con los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha eak y 8 L/eak. En 25 mM NaCl todos los tratamientos disminuyeron en comparación con el testigo (T0), mientras que con 40 mM NaCl el aumentó solo es para 4 L/ha eak con un 37% comparado con las plantas control, sin embargo, comparando todos los tratamientos con el testigo (T0) las clorofilas totales van disminuyendo.

Tabla 3. Pigmentos fotosintéticos en plantas de fresa cultivadas bajo estrés salino.

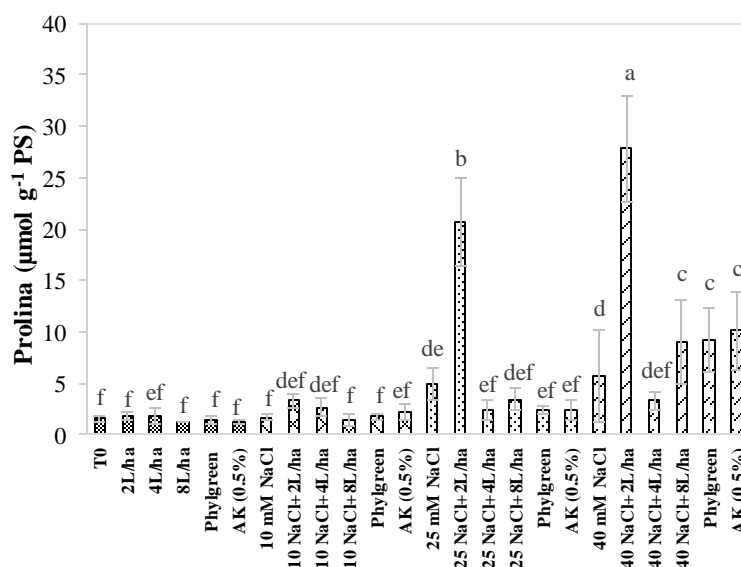
Tratamiento	Clorofila a ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Clorofila totales ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
T0	106.51±18.58bc	39.96±7.06 bcd	104.15±18.17 bc
2L/ha	110.85±9.53 b	42.28±4.42 bc	108.43±9.34 b
4L/ha	96.34±13.68 b-e	35.64±4.72 c-g	94.19±13.36 b-e
8L/ha	94.94±12.54 b-f	39.15±10.32 b-e	92.99±12.69 b-f
Phylgreen	103.09±24.95 bcd	45.26±24.15 b	101.1±24.99 bcd
AK (0.5%)	85.14±8.89 e-h	31.66±3.25 d-i	83.24±8.69 e-h
10 mM NaCl	72.37±24.37 h-k	27.54±10.21 g-l	70.79±23.88 h-k
10 NaCl+2L/ha	167.09±23.39 a	72.38±14.28 a	163.82±23.11 a
10 NaCl+4L/ha	103.95±8.50bcd	37.52±2.53 b-f	101.59±8.28 bcd
10 NaCl+8L/ha	90.56±8.49 c-g	32.52±3.36 d-i	88.49±8.31 c-g
Phylgreen	75.61±8.87 g-j	29.8±3.66 e-k	74.00±8.58 g-j
AK (0.5%)	80.21±26.43 e-i	30.75±10.43 d-j	78.47±25.86 e-i
25 mM NaCl	63.62±3.45 i-l	23.26±0.60 i-l	62.19±3.34 i-l
25 NaCl+2L/ha	66.65±8.15 i-l	24.96±2.77 h-l	68.18±7.95 i-l
25 NaCl+4L/ha	60.63±5.15 jkl	21.46±1.87 jkl	59.23±5.04 jkl
25 NaCl+8L/ha	61.46±2.23 jkl	22.1±1.11 jkl	60.06±2.19 jkl
Phylgreen	56.00±4.91 kl	20.62±1.74 kl	54.75±4.80 kl
AK (0.5%)	53.56±5.62 l	20.06±2.59 l	52.37±5.51 l
40 mM NaCl	64.03±5.49 i-l	23.64±1.93 i-l	62.61±5.35 i-l
40 NaCl+2L/ha	74.33±16.88 g-j	28.14±6.41 f-l	72.7±16.51g-j
40 NaCl+4L/ha	87.74±6.17 d-h	33.88±5.66 c-h	85.84±6.15 d-h
40 NaCl+8L/ha	59.76±9.68 jkl	21.64±3.23 jkl	58.44±9.45 jkl
Phylgreen	52.22±4.18 l	19.58±1.78 l	51.06±4.10 l
AK (0.5%)	77.31±11.92 f-j	29.2±4.26 e-l	75.61±11.65 f-j

T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.



## Aminoácidos

Para el contenido de prolina en hojas de fresa, bajo condiciones no salinas y con 10 mM NaCl no se presentaron diferencias significativas, mientras que con 25 mM NaCl la prolina incrementó en el tratamiento 2 L/ha eak con un 321% comparado con plantas control. Con 40 mM NaCl el aumento de prolina fue con los tratamientos 2 L/ha, 8 L/ha eak, Phylgreen, AK 0.5%, con un 390%, 79%, 63%, y 58% comparado con las plantas control (Figura 1).



**Figura 1.** Contenido de prolina en hojas de fresa con estrés salino. PS) peso seco, T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

## Expresión de genes

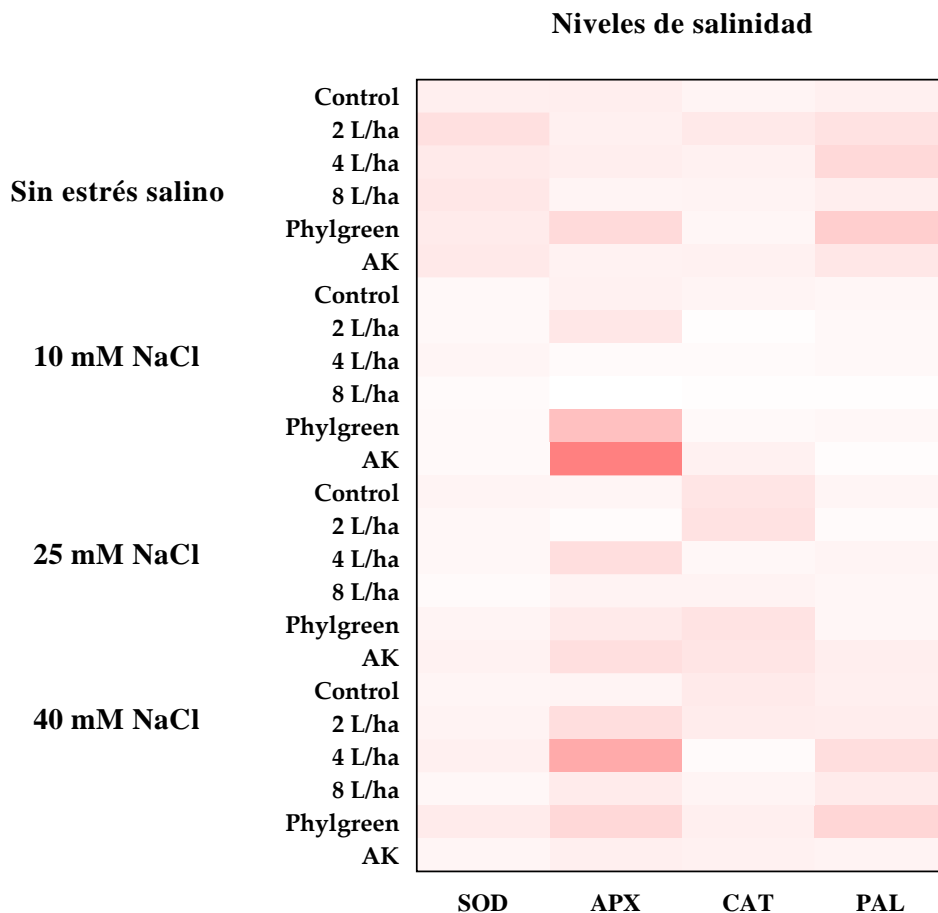
En el análisis de expresión de genes (Figura 2) bajo los diferentes niveles de salinidad (0 mM NaCl, 10 mM NaCl, 25 mM NaCl, y 40 mM NaCl) presentaron diferencia significativa. En condiciones no salinas el tratamiento 2 L/ha eak aumentó la expresión del gen SOD en 1.27 veces respecto al control. Mientras que la aplicación de Phylgreen aumentó la expresión del gen APX en 1.70 veces en comparación con el control. Para el gen CAT el aumento de expresión fue de 1 veces en comparación con el control con el tratamiento 2 L/ha eak. En el gen PAL, los tratamientos Phylgreen, y 4 L/ha eak aumentó

la expresión en 2.91 veces, y 1.97 veces comparados con el control, también el tratamiento 2L/ha eak se expresó 1.15 veces, pero no fue diferente del control.

En 10 mM NaCl, la expresión del gen SOD fue baja para todos los tratamientos y no se presentaron diferencias significativas. Para el gen APX, el tratamiento AK 0.5% incrementó su expresión 42.85 veces, en comparación con su control, también el tratamiento Phylgreen aumentó en un 4.23 veces, pero no fue diferente del control. Mientras que para el gen CAT, los tratamientos, Phylgreen, 4 L/ha, 8 L/ha, y 2 L/ha eak, se reprimieron entre 0.418 veces a 0.807 veces en comparación con su control. Para el gen PAL, los tratamientos 0.5%AK, y 8 L/ha eak. se reprimieron 0.459 veces, y 0.594 veces respecto a su control.

En 25 mM NaCl, el gen SOD se reprimió 0.439 veces respecto a su control con el tratamiento 8 L/ha eak. Con el gen APX, los tratamientos 4 L/ha eak, 0.5% AK, incrementó la expresión 2 veces, y 1.90 veces comparado con su control. Para el gen CAT, el tratamiento 4 L/ha eak reprimió la expresión 1.57 veces respecto al control. En el gen PAL, solo el tratamiento 0.5% AK aumentó 0.610 veces respecto a su control.

En el nivel más alto de salinidad de 40 mM NaCl, el gen SOD, con los tratamientos Phylgreen, y 4 L/ha eak, aumentó su expresión 0.844 veces, y 0.442 veces respecto a su control. Para el gen APX, nuevamente los tratamientos 4 L/ha eak, y Phylgreen aumentó su expresión 6.41 veces y 2.42 veces respecto al control, también el tratamiento 2 L/ha eak aumentó 1.92 veces, pero no fue diferente del control. Mientras que para el gen CAT no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Por otra parte, el gen PAL, solo en los tratamientos Phylgreen, y 4 L/ha eak aumentó su expresión 2.08 veces y 1.41 veces en comparación con su control.



**Figura 2.** Mapa de calor de la expresión relativa de genes de defensa en plantas de fresa con diferentes niveles de salinidad: SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, PAL: Fenilalanina amonio liasa, NaCl: cloruro de sodio. La escala de color representa, color rojo intenso valores altos de expresión génica, colores rojo claro, representa el nivel bajo de expresión génica.

### Contenido de minerales en hoja

En la tabla 4 se muestran los resultados de la concentración en porcentaje de macroelementos en peso seco de hojas de fresa. La acumulación de sodio se fue incrementando conforme a cada nivel de salinidad, siendo 25 mM NaCl, y 40 mM NaCl las concentraciones con el mayor contenido de sodio foliar con la aplicación de 8 L/ha eak el aumento fue de 336% más que su control, con la aplicación de 2 L/ha, y 4 L/ha eak el aumento fue de 260%, y 119% más que las plantas control. Respecto al contenido de K,

Mg, y Ca, hubo acumulación en todos los tratamientos, con 10 mM NaCl la aplicación foliar de AK (0.5%) incremento 31%, 41%, y 67%, comparado con su respectivo control, así mismo la aplicación de 4 L/ha eak aumentó el contenido de K en un 44% más que su control. Con 25 mM NaCl, y 40 mM NaCl con la aplicación de 2 L/ha eak aumentó el contenido de Ca en un 60%, y 51% comparado con T0. El contenido de P disminuyó con 25 mM NaCl con la aplicación de los tratamientos 2 L/ha, y 8 L/ha eak en un 42%, y 35% comparado con su control.

Tabla 4. Contenido de minerales (macroelementos) en hoja de fresa con estrés salino expresados en g elemento/100 g de tejido seco.

Tratamientos	Na	K	Mg	Ca	P
T0	0.04±0.04e	2.50±0.26bc	0.34d±0.02d	0.93±0.21d	0.49±0.01a-e
2L/ha	0.02±0.00e	2.79±0.28abc	0.35±0.029cd	1.15±0.12bcd	0.52±0.03abc
4L/ha	0.02±0.00e	2.79±0.13ac	0.37±0.02ad	1.28±0.20bcd	0.50±0.06a-e
8L/ha	0.03±0.01e	2.76±0.06bc	0.38±0.01ad	1.25±0.05bcd	0.51±0.01a-d
Phylgreen	0.02±0.02e	2.60±0.33bc	0.36±0.03d	1.10±0.13cd	0.50±0.05a-d
AK (0.5%)	0.06±0.05e	2.65±0.32bc	0.38±0.03bcd	1.21±0.16bcd	0.49±0.05a-e
10 mM NaCl	0.04±0.00e	2.70±0.36bc	0.34±0.05d	1.09±0.15cd	0.50±0.06a-e
10NaCl+2L/ha	0.07±0.01de	2.96±0.142b	0.41±0.01ad	1.48±0.21abc	0.52±0.02abc
10 NaCl+4L/ha	0.04±0.00e	2.71±0.14bc	0.41±0.00ad	1.57±0.08ab	0.57±0.02a
10 NaCl+8L/ha	0.04±0.012e	2.76±0.23bc	0.39±0.03ad	1.46±0.317bc	0.48±0.05a-e
Phylgreen	0.04±0.019e	2.42±1.16bc	0.35±0.17d	1.43±0.77abc	0.41±0.18c-g
AK (0.5%)	0.05±0.02e	3.54±0.25a	0.48±0.05a	1.83±0.03a	0.55±0.02ab
25 mM NaCl	0.11±0.00de	2.66±0.10bc	0.43±0.011ad	1.44±0.15abc	0.54±0.01ab
25 NaCl+2L/ha	0.27±0.01ce	2.96±0.11ab	0.47±0.00ab	1.49±0.07abc	0.38±0.02efg
25 NaCl+4L/ha	0.13±0.03de	2.54±0.17bc	0.37±0.03ad	1.05±0.10cd	0.44±0.02b-g
25 NaCl+8L/ha	0.48±0.40bc	2.64±0.63bc	0.38±0.09ad	1.08±0.31cd	0.40±0.07d-g
Phylgreen	0.25±0.017ce	2.69±0.12bc	0.40±0.01ad	1.08±0.02cd	0.44±0.01bg
AK (0.5%)	0.27±c0.05de	2.81±0.30abc	0.40±0.05ad	1.20±0.11bcd	0.47±0.04a-e
40 mM NaCl	0.41±0.020cd	2.84±0.14abc	0.44±0.01ad	1.34±0.03bcd	0.44±0.01b-g
40 NaCl+2L/ha	1.48±0.008a	2.82±0.02abc	0.46±0.00ac	1.41±0.07abc	0.45±0.01a-f
40 NaCl+4L/ha	0.90±0.88b	2.27±1.15bc	0.36±0.17bd	1.11±0.54cd	0.35±0.17fg
40 NaCl+8L/ha	0.48±0.12c	2.66±0.20bc	0.43±0.01ad	1.36±0.12bd	0.46±0.03af
Phylgreen	0.58±0.28bc	2.10±1.11c	0.34±0.17d	1.08±0.53cd	0.33±0.16g
AK (0.5%)	0.52±0.06c	2.77±0.09bc	0.44±0.00ad	1.37±0.06bcd	0.46±0.05a-f

T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

En la tabla 5 se muestra los resultados de la concentración en partes por millón de microelementos en peso seco de hojas de fresa. En condiciones sin estrés salino hubo mayor acumulación de Fe, Cu, y Mn, con la aplicación de los tratamientos 2 L/ha, y 4 L/ha eak el aumento de Fe fue con un 108%, y 74% comparado con el testigo (T0), mientras que con el tratamiento 8 L/ha eak el aumento de Cu, y Mn fue de 128%, y 63% comparados con el testigo (T0). Con 25 mM NaCl hubo una disminución de Fe, Zn, y Mn, los tratamientos Phylgreen, 4 L/ha, y 8 L/ha eak disminuyo el Fe en un 66%, 107%, 156% comparados con su control. Con 40 mM NaCl aumentó el contenido de Fe con los tratamientos 2 L/ha, 8 L/ha, y 4 L/ha eak con un 372%, 308%, 234% comparados con su control. En la acumulación de Cu, con 40 mM NaClhubo un aumentó con 2 L/ha eak con un 166% comparado con el testigo (T0), mientras que para Zn y Mn la acumulación fue con la aplicación de 8 L/ha eak con un 57%, y 51% comparados con su control.

Tabla 5. Contenido de minerales (microelementos) en hoja de fresa con estrés salino expresados en mg kg<sup>-1</sup>.

Tratamientos	Fe	Cu	Zn	Mn
T0	27.33±11.12e-i	6.63±1.98cd	21.13±3.20a-e	14.83±1.55e-j
2L/ha	56.90±10.77a	11.40±6.73bcd	22.70±0.44a-d	19.23±4.84a-i
4L/ha	47.70±8.55abc	6.10±2.21d	18.57±0.85a-f	18.60±4.78a-i
8L/ha	22.87±15.78f-i	15.13±10.94ab	16.27±1.42d-g	24.27±2.41a
Phylgreen	16.70±2.23ghi	10.00±0.56bcd	16.93±1.62b-g	17.67±3.93b-j
AK (0.5%)	29.43±15.05d-h	9.43±1.30bcd	17.73±0.23a-f	19.80±2.08a-i
10 mM NaCl	45.33±18.66a-d	7.27±2.18cd	18.27±1.67a-f	18.53±4.06a-i
10 NaCl+2L/ha	44.53±13.67a-e	6.70±2.29cd	20.67±3.94a-f	21.57±2.45abc
10 NaCl+4L/ha	49.10±0.36abc	8.60±2.52cd	23.87±3.35a	23.57±4.40abc
10 NaCl+8L/ha	56.77±7.15a	7.57±2.84cd	23.23±0.80abc	23.80±4.85ab
Phylgreen	52.97±16.09ab	8.20±1.77cd	21.53±6.29a-e	20.30±8.77a-g
AK (0.5%)	40.00±7.20a-f	7.10±0.62cd	18.80±2.09a-f	20.83±1.56a-f
25 mM NaCl	47.33±8.75abc	7.50±0.20cd	22.43±0.32a-d	21.37±0.12a-e
25 NaCl+2L/ha	33.40±9.68c-g	10.07±2.08bcd	14.20±1.85fg	14.43±0.40f-j
25 NaCl+4L/ha	22.87±3.20f-i	8.07±1.59cd	17.80±2.67a-f	21.57±3.21a-d
25 NaCl+8L/ha	18.43±7.31ghi	8.73±2.15cd	17.73±5.23a-f	13.27±4.11ij
Phylgreen	28.43±4.92d-h	9.23±0.40bcd	19.37±1.19a-f	23.90±0.89ab
AK (0.5%)	51.87±18.31ab	10.37±3.71bcd	21.30±6.84a-e	16.17±1.50d-j
40 mM NaCl	10.77±7.51 i	11.70±3.16a-d	15.07±0.90efg	14.07±0.59g-j

40 NaCl+2L/ha	50.90±4.05ab	17.67±0.50a	20.07±2.50a-f	19.93±1.10a-h
40 NaCl+4L/ha	36.00±6.76b-f	12.43±7.91abc	16.60±12.04c-g	13.53±7.83hij
40 NaCl+8L/ha	44.13±11.79a-e	12.63±3.32abc	23.77±2.94ab	21.33±1.88a-e
Phylgreen	13.90±9.77hi	9.10±5.28bcd	10.50±8.92g	11.33±6.70j
AK (0.5%)	26.73±6.90f-i	8.77±1.16cd	15.23±0.25efg	17.03±5.09c-j

T0: control, NaCl: cloruro de sodio. Letras diferentes dentro de cada columna indican diferencias significativas entre tratamientos (LSD,  $p < 0.05$ ). Los intervalos de  $\pm$  barra representan la desviación estándar.

#### 4. DISCUSIÓN

La presente investigación, se evaluó el efecto bioestimulante de un extracto que contiene ácido kójico obtenido por fermentación líquida, y además del uso de ak grado reactivo, aplicado vía foliar en plantas de fresa sometidas a diferentes niveles de estrés salino. Se consideró como referencia la aplicación de un bioestimulante comercial llamado Phylgreen que es un extracto puro de algas *Ascophyllum nodosum* y que es utilizado como antiestresante acelerando la recuperación y reduciendo los efectos generados por factores abióticos, como: salinidad, sequía y heladas. Sin embargo, uno de los inconvenientes en esta investigación, es la falta de estudios de referencia fisiológicos, bioquímicos, y nivel molecular en cultivos hortícolas cuya aplicación foliar implique la participación del metabolito secundario ácido kójico. El AK en grado reactivo, solo se ha considerado en aplicación postcosecha de diferentes vegetales y frutos susceptibles al pardeamiento (Yan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023), como regenerador de hongos fructíferos (Zhang *et al.*, 2017), y también como compuesto bioactivo natural con actividad antifúngica al inhibir la síntesis de quitina y melanina contra el patógeno *S. sclerotiorum* en cultivo de soya (Zhu *et al.*, 2022). Ante esta situación es un poco complicado discutir los datos obtenidos, por lo tanto, de acuerdo otras investigaciones presentadas por diferentes autores en la aplicación de bioestimulantes de plantas, se espera que los resultados del presente trabajo sean de alguna manera los esperados. Aunado a esto, los posibles productos generados, como extractos de origen microbiológico, deberían de incrementar la biomasa y el rendimiento de los cultivos agrícolas o bien disminuir el efecto negativo de diferentes estreses (Bulgari *et al.*, 2017), en este caso el estrés originado por la sal.

##### Actividad enzimática en hojas de fresa

El estrés salino genera cambios en el ambiente interno de las plantas, ocasionando un desequilibrio metabólico, por lo tanto, hay una acumulación de ROS, que afectan la

estructura de la membrana celular, por lo que, para mantener un equilibrio las plantas inician sus propios mecanismos de defensa para hacer frente al estrés salino (Wang *et al.*, 2023). Las plantas poseen un sistema de defensa antioxidante, como defensores de primera línea como es en la enzima SOD, que actúa catalizando,  $O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Ighodaro y Akinloye, 2018). Posteriormente, CAT elimina  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Hussain *et al.*, 2019). La aplicación de las diferentes concentraciones de extracto de ácido kójico, incremento algunas actividades enzimáticas, como SOD, APX, y GPX, tanto en condiciones normales, y en los diferentes niveles de salinidad, mientras que la actividad de CAT, solo aumento con la aplicación del tratamiento AK 0.5 (%), en condiciones normales, y con 40 mM NaCl, y con 25 mM Na Cl todos los tratamientos tuvieron menor actividad, al igual que en la enzima GPX solo hubo una disminución con el tratamiento 8 L/ha eak con 40 mM NaCl. De alguna manera la aplicación de los diferentes tratamientos ayudó a regular el estrés generado por la sal, haciendo más eficiente la eliminación de ROS, mediante la actividad de algunas enzimas antes mencionadas. Para que las plantas tengan mejor protección cuando se encuentran bajo estrés oxidativo, las moléculas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas regulan sus actividades, al mantener el equilibrio redox, en este caso APX conecta en ambas vías (Kesawat *et al.*, 2023). Bajo condiciones salinas los cultivos acumulan exceso de iones en la vacuola para evitar la acumulación en el citoplasma que puede afectar las reacciones enzimáticas (Zulfiqar *et al.*, 2022), por lo tanto, la enzima glutatión peroxidasa (GPX) también forma parte de unas principales eliminadoras de  $H_2O_2$ , debido a que su función le permite actuar en los orgánulos como, citosol, y vacuola (Kesawat *et al.*, 2023). Algunos estudios, como el reportado por Zuzunaga-Rosas *et al.*, 2022, quienes utilizaron un bioestimulante a base de polifenoles, glicina betaína (2 L/ha y 4 L/ha) en cultivo de tomate con salinidad en C.E: 7.9 dS/m, las enzimas SOD y CAT, no se vieron influenciadas con la aplicación del bioestimulante, atribuyendo a que una activación excesiva de enzimas se debe a un estrés oxidativo severo. Caso contrario a lo que ocurrió con la aplicación del extracto de ácido kójico, en donde los tratamientos incrementaron la actividad de las enzimas SOD, APX y GPX, recalando también que las plantas de fresa son cultivos muy sensibles a la salinidad, por lo que, los tratamientos ayudaron a regular el estrés salino, o bien disminuir el daño oxidativo en las plantas estresadas, que de acuerdo a lo reportado por (Desoky *et al.*, 2021), en plantas de

haba con estrés salino (150 mM NaCl) y con aplicación foliar de extracto de grano de maíz (60 g L<sup>-1</sup>) junto con propóleo se incrementó la actividad enzimática de SOD, CAT, APX. En otros experimentos, con la aplicación de extracto de algas marinas (100 mL/L), en plantas de tomate en condiciones no salinas, la actividad SOD y CAT incrementaron, sin embargo, con la aplicación de extracto de algas bajo condiciones salinas (300 mM NaCl), disminuyeron la actividad de SOD y APX, mientras que CAT no presentó diferencias significativas (Hernández-Herrera *et al.*, 2022). Así mismo el ácido kójico es un metabolito secundario que se considera como un potente eliminador de especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno e hidroxilo (Niwa y Akamatsu, 1991), teniendo beneficios contra el envejecimiento y el cáncer en los seres humanos (Talakoub *et al.*, 2009). La actividad de PAL como precursora de la síntesis de los fenilpropanoides, incremento solo en algunos tratamientos, en condiciones no salinas el tratamiento AK (0.5%), mientras que con 25 mM NaCl fue para los tratamientos 2 L/ha, 4 L/ha, y 8 L/ha eak. Por otra parte, la aplicación foliar de extractos de alga parda (5 mg/mL) en plantas de fresa incremento el contenido de la enzima PAL (0.89 U/mg) (Tajdinian *et al.*, 2022). Como función importante de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), es catalizar la desaminación no oxidativa de la fenilalanina a ácido *trans*-cinámico (AC) (Ferrer *et al.*, 2008), como un sustrato común para la síntesis de diferentes compuestos fenilpropanoides (Şirin y Aslım, 2019), por lo tanto, una regulación de la actividad PAL se relaciona de forma positiva a una mayor producción de fenilpropanoides (Vogt, 2010). De acuerdo a lo obtenido, el contenido de proteínas, solo con condiciones salinas hubo incrementos, en los niveles con 25 mM NaCl (AK 0.5%), y con 40 mM NaCl (8 L/ha eak). Las proteínas tienen diferentes funciones, tanto enzimáticas, estructurales, y funcionales en la fotosíntesis, biosíntesis, transporte, protección, señalización entre otros (Rasheed *et al.*, 2020), bajo condiciones estresantes se induce la producción de proteínas protectoras para la preservación de procesos fisiológicos y bioquímicos (Zhou *et al.*, 2023). La cantidad de proteínas resulta ser mayor en cultivares tolerantes a la salinidad, en comparación con los cultivos sensibles (Athar *et al.*, 2022), en este caso, el cultivo de fresa es sensible al estrés salino, por ende, hay una mayor disminución y se presenta en el nivel más alto de salinidad con 40 mM NaCl. Cabe mencionar que la acción de cada bioestimulante dependerá de su composición, por ejemplo, los que son de extractos botánicos,



regularmente tiene un alto contenido de azúcares polifenoles y proteínas, que podrían ser eficientes al aplicarse en plantas con estrés abiótico (Naboulsi *et al.*, 2022). Por otra parte, el ácido kójico es un compuesto fenólico (Ermis *et al.*, 2023), que, por sus características ácido débiles, hasta el momento solo se ha implementado en alimentos para prevención del pardeamiento en frutos y vegetales, pero no se tiene información sobre su uso en cultivos.

### **Actividad antioxidante en hojas de fresa**

La actividad antioxidante no enzimática, en donde se involucran diferentes compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides, se encuentran los fenoles, flavonoides, y antocianinas entre otros, que tienen la función de desintoxicar o mantener en equilibrio las especies reactivas de oxígeno, en las diferentes reacciones celulares de las plantas (Hernández-Hernández *et al.*, 2019 ;Azeem *et al.*, 2023), además de incluir glutatión, y vitaminas c cuya función es interrumpir la acción indeseable de las ROS (Swietek *et al.*, 2019). Otra manera de eliminación de  $H_2O_2$ , es por medio del ciclo Asc-GSH, cuya función se realiza en diferentes compartimentos celulares, como citosol, mitocondria, cloroplastos y peroxisomas (Dumanović *et al.*, 2021). Los antioxidantes no enzimáticos, fenoles totales, flavonoides totales, incrementaron en condiciones salinas con la aplicación de eak. La aplicación foliar de hidrolizados de proteínas ( $4 \text{ mL L}^{-1}$ ), y extracto de algas tropicales ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ), en lechuga roja, incrementaron el contenido de fenoles totales en un 23% y 39%, y flavonoides totales en un 26% y 41% (Giordano *et al.*, 2022). Otros autores, en estrés salino con 300 mM NaCl y aplicación de extracto de algas (100 mL/L), los fenoles totales disminuyeron en un 5%, mientras que los flavonoides aumentaron en un 8% (Hernández-Herrera *et al.*, 2022). Por lo tanto, los bioestimulante pueden incrementar el contenido de metabolitos secundarios, sin embargo, la efectividad de los bioestimulante, será variable en el uso de concentraciones sean bajas o altas, de la composición del bioestimulante, las características de la planta, la forma de aplicación, factores ambientales entre otros (Vioratti *et al.*, 2023). En otros estudios, con la aplicación foliar de extracto de grano de maíz ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) junto con propoleo ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) como bioestimulante, en cultivo de habas con 150 Mm NaCl, aumentó la vitamina C en un 15%, y glutatión reducido con un 9.6% respectivamente, mientras que en condiciones no salinas se presentaron efectos negativos (Desoky *et al.*, 2021). En el presente experimento, el GSH

aumento en condiciones sin salinidad con el tratamiento 4 L/ha eak, con 10 mM NaCl con la aplicación de AK (0.5%), sin embargo, con 40 mM NaCl disminuyó con el tratamiento 4 L/ha eak, para la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se requiere una alta proporción de GSH / GSSG (Latique *et al.*, 2021), sin embargo, los aumentos solo fueron favorables para AK comercial, podría atribuirse a que en ciertos niveles de salinidad, hay mayor actividad de otras enzimas responsables de la eliminación de ROS, por lo que, glutatión reducido no requirió aumentarse. En cuanto a la vitamina c, sin estrés salino disminuyó en algunos tratamientos, mientras que, en los diferentes niveles de salinidad con la aplicación de los tratamientos se presentaron incrementos. El ácido ascórbico es fundamental para eliminar el daño oxidativo y mejorar la tolerancia al estrés abiótico mediante la regeneración de ASC (Xiao *et al.*, 2021). En otra investigación, la salinidad en condiciones de C.E: 6 dS m<sup>-1</sup> y C.E: 9 dS m<sup>-1</sup>, ABTS incrementó, sin embargo, la aplicación de proteínas hidrolizadas (3 mL L<sup>-1</sup>), la capacidad antioxidante ABTS se vio afectado negativamente disminuyendo en un 20% (El-Nakhel *et al.*, 2022). La respuesta en la capacidad antioxidante puede ser variable ya sea implementando un ensayo por ABTS, DPPH o FRAP bajo condiciones estresantes, siendo que se puedan correlacionar de forma positiva o negativa (Bantis *et al.*, 2020), indicando que el protocolo establecido puede jugar un papel crucial en los resultados establecidos (El-Nakhel *et al.*, 2022). Esto se observa en el experimento, ya que la capacidad antioxidante de ABTS disminuyó en condiciones no salinas, y solo con 25 mM NaCl hubo un aumento con la aplicación de Phylgreen, mientras que para DPPH se tuvieron incrementos con la aplicación de 2 L/ha, 4 L/ha eak, Phylgreen, y AK (0.5%) en ausencia de estrés salino y salinidad con 25 mM NaCl. Aunque de la misma manera en cuanto más aumenta la salinidad la capacidad antioxidante se ve más afectada aún con la aplicación de los tratamientos, y esa tendencia fue mostrada para ABTS también.

### **Pigmentos fotosintéticos**

La fotosíntesis es la fuente de energía para el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo las clorofilas a y b las que influyen directamente en la capacidad fotosintética de las plantas (Li *et al.*, 2018), las composiciones de los complejos de antena son distintas para el fotosistema I enriquecida con clorofila a, y fotosistema II con clorofila b (Gururani *et al.*, 2015). Cuando las plantas, sobre todo las que son sensibles a la salinidad como es

la fresa, son expuestas a condiciones salinas se genera una disminución de las clorofilas y una fotosíntesis más baja (Alluqmani y Alabdallah, 2022). Se ha reportado que bajo condiciones salinas con 50 mM NaCl en cultivo de fresa, el contenido de clorofilas a, y b, disminuyo, pero con la adición de ácidos húmicos (300 ppm) se mejoró el contenido de clorofilas a y b en un 22%, y 26%, reduciendo los efectos de la salinidad (Saidimoradi *et al.*, 2019). En un estudio realizado por El-Nakhel *et al.*, 2022, la aplicación de un bioestimulante a base de proteínas hidrolizadas ( $3 \text{ mL L}^{-1}$ ) aplicadas vía foliar en espinaca incremento solamente el contenido de clorofilas totales en un 4%, mientras que las plantas que solo tuvieron estrés salino con CE:  $3 \text{ dS m}^{-1}$ , CE:  $6 \text{ dS m}^{-1}$ , tuvieron mayor contenido de clorofilas a y b. Entre otros tipos de bioestimulante, como son los preparados a base de microorganismos como hongos benéficos, tienden a incrementar los pigmentos fotosintéticos, como lo reporta Todeschini *et al.*, 2018, al aplicar una mezcla de *Funneliformis mosseae* + *Pseudomonas fluorescens*, aumentaron el contenido de clorofilas a y b en un 11% y 18%. Aunque si bien el extracto de ácido kójico, es producido por medio de fermentación líquida mediante la inoculación de una cepa, y no, mediante la aplicación del microorganismo al suelo o sustrato, si no el subproducto derivado de este, y que, de acuerdo al presente experimento, la aplicación foliar del extracto de ácido kójico, aumentaron el contenido de clorofilas a, b y totales, bajo estrés salino, mientras que plantas sin estrés, solo el tratamiento AK (0.55) disminuyo el contenido de clorofila a. Algunos autores mencionan que el uso de bioestimulantes regularmente ayudan a incrementar la concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas (Bulgari *et al.*, 2017).

#### **Aminoácidos en hojas de fresa**

La prolina es un aminoácido conocido como osmoprotector de plantas que están sometidas a estrés abiótico (Hayat *et al.*, 2012), cuya función es, mejorar la estabilidad de las proteínas, dar protección a la integridad de las membranas, además de aumentar el potencial de absorción de agua y facilitar la activación de enzimas antioxidantes (Hosseinfard *et al.*, 2022). En este experimento, la prolina, incremento en el tratamiento 2 L/ha eak con 25 mM NaCl, mientras que con 40 mM NaCl, los tratamientos que aumentaron fueron Phylgreen, 8 L/ha, y 2 L/ha eak. En estudios realizados en plantas de fresa reportaron que el contenido de prolina aumento bajo condiciones salinas a 50 mM NaCl, sin embargo, con la aplicación de ácidos húmicos a 300 ppm, en conjunto con el

estrés, la prolina disminuyó en un 26% (Saidimoradi *et al.*, 2019). Por otra parte, el uso de una combinación de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas de fresa sometidas a estrés salino (35 mM NaCl), aumentaron el contenido de prolina en un 82% (Arikan S *et al.*, 2020). Mientras que, en otras especies de plantas como tomate, el aumento de prolina fue 3.6 veces más en plantas tratadas con extractos de algas junto con salinidad a 300 mM NaCl (Hernández-Herrera *et al.*, 2022). Con la aplicación de una mezcla de extractos de algas y cianobacterias al 5%, bajo condiciones salinas de 120 mM NaCl y 150 mM NaCl en plantas de tomate, hubo mayor acumulación de prolina desde 140% a 87% respectivamente (Mutale-joan *et al.*, 2021). Por lo tanto, conforme incrementaban los niveles de salinidad, las aplicaciones de algunos tratamientos, ayudaron a la acumulación de prolina, ejerciendo protección en las plantas.

### **Expresión de genes en hojas de fresa**

El reconocimiento de un ambiente de estrés y la adaptación al estrés ambiental, además de completar su ciclo de vida, las plantas han desarrollado un mecanismo complejo que regula estrictamente la expresión génica a través de señales precisas (Liang *et al.*, 2020). Las plantas poseen un sistema de defensa antioxidante, que incluye las enzimas, SOD, CAT, APX, que protege los componentes de la membrana en la célula (Hasan *et al.*, 2020), y PAL en su papel en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Fan *et al.*, 2022). A nivel molecular, los mecanismos de respuesta de las plantas al estrés son multifacéticos, las plantas pueden reaccionar al estrés activando factores de transcripción, por ejemplo, WRKY, que a su vez conduce a la regulación positiva de genes específicos, implicados en actividades antioxidantes y metabolismo secundario (Gedeon *et al.*, 2022 : Zhou *et al.*, 2023). En el presente experimento se observaron tendencias en alza en algunos tratamientos con efecto bioestimulante bajo los diferentes niveles de salinidad. Las plantas sin estrés salino, el tratamiento 2 L/ha eak aumentó significativamente el gen SOD y CAT, el tratamiento 4 L/ha eak aumento el gen PAL, y el bioestimulante comercial Phylgreen aumento APX y PAL. Con 10 mM NaCl, el tratamiento AK (0.5%) aumentó el gen APX. En 25 mM NaCl, solo en los tratamientos 4 L/ha eak aumentó el gen APX, y en el tratamiento AK (0.5%) incrementó APX y PAL. Con 40 mM NaCl los tratamientos 4 L/ha eak, y Phylgreen se expresaron los genes SOD, APX, y PAL. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la aplicación de extracto de ácido kójico, al igual que AK

comercial, y no esta demás mencionar a Phylgreen, activan los mecanismos moleculares de respuesta de las plantas sometidas a estrés salino. En estudios realizados por (Gedeon *et al.*, 2022), utilizaron soluciones bioestimulantes (50 mL), que incluían biocompost (contiene carbono orgánico y MO, ácidos húmicos, y fulvicos, bacterias, actinobacterias y hongos, y minerales), biofertilizante (sin moos, ácidos fúlvicos en mayor cantidad y húmicos, polisacáridos, carbonatos, calcio, fósforo inorgánico, enzimas y fitohormonas.), y soluciones correctoras de ARN (contiene los principios activos de la solución de biocompost, pero en mayor concentración), en plantas de tomate a 150 mM NaCl, indicando que las plantas tratadas con biocompost y estrés, aumentaron la expresión del gen SOD, mientras que el uso de biofertilizante, y corrector de ARN regularon significativamente a la baja en los genes SOD, y APX. Por otra parte, en un estudio realizado por Sariñana- Aldaco *et al.*, 2022, con el uso de extractos hidroalcohólicos de *Sargassum* spp., y bioestimulante comercial en plántulas de tomate a 100 mM NaCl, el uso de sargazo en condiciones no salinas, presento un aumento de la expresión del gen *Fe*-SOD, APX, y PAL, mientras que, bajo condiciones de estrés, con la aplicación de SSE los genes *Fe*-SOD, APX, CAT, y PAL aumentaron su expresión génica, con el bioestimulante comercial expreso los genes *Fe*-SOD APX, en condiciones salinas, y en condiciones sin sal, fueron los genes, CAT, y APX. La aplicación de bioestimulante vegetales, ayudan a mejorar la tolerancia a la sal en plantas por medio de vías de señalización, y regulación de maquinaria redox (SOD, CAT, APX, GPX, Prx, ácido ascórbico (AsA), glutatión (GSH), entre otros) (Ahmad A *et al.*, 2022). Por ende, se podría considerar que el uso del extracto de ácido kójico, puede ayudar a estimular las plantas de fresa en condiciones normales y salinas, desencadenando la expresión de genes protectores contra el estrés salino. De acuerdo a los diferentes estudios informados, los bioestimulantes abarcan un término amplio que van desde formulaciones microbianas y no microbianas, hidrolizados de proteínas, extractos de algas y botánicos, quitosan, tanto compuesto inorgánicos, entre otros (du Jardin, 2015), que tienen efectos positivos en las plantas incrementando su calidad y rendimiento. Además de que la composición de algunos de ellos que van desde vitaminas, minerales, aminoácidos, fitohormonas, ácidos fenólicos, flavonoides, polisacáridos, carbohidratos entre otros que estimulan a las plantas a tener mejor funcionamiento, de forma general, como la inducción de respuestas

fisiológicas de las plantas, como crecimiento, rendimiento, calidad mejorada de frutos, contenido nutricional mejorado entre otros, además de ayudar a hacer frente al estrés del tipo abiótico (Battacharyya *et al.*, 2015; Drobek *et al.*, 2019).

### **Contenido de minerales**

La salinidad genera deficiencia de nutrientes minerales, como potasio, debido a que altas concentraciones de Na en el suelo reducen la actividad de diferentes nutrientes esenciales haciéndolos menos disponibles para las plantas (Shabala *et al.*, 2008). El aumento de salinidad en el tejido de la hoja fue incrementando conforme a cada nivel. En cultivo de fresa con estrés por salinidad a 70 mM NaCl aumento la acumulación de Na, y disminuyo la absorción de K (Abu Zeid *et al.*, 2023), sin embargo, en el presente estudio la acumulación de K no se vio afectada y se vio favorecida solo con algunos tratamientos (AK (0.5%), 4 L/ha eak). La aplicación foliar de un producto comercial Bluestim en plantas de fresa con salinidad de 34 mM NaCl no afecto la concentración de Ca, K, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Mn, mientras que el Na, en comparación con su control no hubo diferencias, pero en comparación con su blanco control aumento 6 veces más (Ntanos *et al.*, 2021). En condiciones sin salinidad los bioestimulante a base de hidrolizado de proteínas y extracto de plantas tropicales aplicado vía foliar aumento el contenido de Ca, K, y Mg (Giordano *et al.*, 2022). En condiciones de 25 mM NaCl, y 40 mM NaCl hubo una mejor acumulación de Ca con el tratamiento 2 L/ha eak. Por otra parte, los microelementos, Fe, Cu, Mn, la acumulación fue en condiciones sin estrés con la aplicación del extracto de ácido kójico, y en condiciones salinas a 40 mM NaCl se acumuló Fe, Cu, Zn, y Mn. El AK se ha reportado como un agente quelante de  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , y  $Al^{3+}$ , siendo un candidato prometedor, que pudiera aplicarse en áreas agrícolas (Nurchi *et al.*, 2019).

## **5. CONCLUSIÓN**

El extracto de ácido kójico aplicado vía foliar en plantas de fresa bajo condiciones normales y estresantes por salinidad, favoreció la actividad los compuestos enzimáticos y no enzimáticos, además de aumentar el contenido de pigmentos fotosintéticos, y prolina. De la misma manera la expresión de los genes con la aplicación del extracto de ácido kójico, ácido kójico grado reactivo, y el bioestimulante comercial, incremento la expresión génica. Además, el eak de aumento el contenido mineral en hojas como K, Ca, Fe, Cu, y

Mn. Aunque se requiere de más investigación para comprender los diferentes mecanismos de respuesta a estrés con el uso del extracto de ácido kójico, este trabajo da una iniciativa a posibles investigaciones futuras, para el aprovechamiento de este metabolito que está contenido en el extracto, y sea aplicado a otros cultivos diferentes, bajo otras condiciones de estrés abiótico o biótico.

## REFERENCIAS:

- Alluqmani, S. M., & Alabdallah, N. M. (2022). Dry waste of red tea leaves and rose petals confer salinity stress tolerance in strawberry plants via modulation of growth and physiology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21(8), 511–517. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2022.02.003>
- Abu Zeid IM, Mohamed FH, Metwali EMR. Responses of two strawberry cultivars to NaCl-induced salt stress under the influence of ZnO nanoparticles. *Saudi J Biol Sci*. 2023 Apr;30(4):103623. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103623. Epub 2023 Mar 10. PMID: 36970252; PMCID: PMC10036939.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49(6), 462–468. Retrieved from <https://europepmc.org/article/med/7884635>
- Athar, H. U. R., Zulfiqar, F., Moosa, A., Ashraf, M., Zafar, Z. U., Zhang, L., ... Siddique, K. H. M. (2022). Salt stress proteins in plants: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 13, 5085. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.999058/BIBTEX>
- Avestan, S., Ghasemnezhad, M., Esfahani, M., & Byrt, C. S. (2019). Application of Nano-Silicon Dioxide Improves Salt Stress Tolerance in Strawberry Plants. *Agronomy* 2019, Vol. 9, Page 246, 9(5), 246. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY9050246>
- Azeem, M., Pirjan, K., Qasim, M., Mahmood, A., Javed, T., Muhammad, H., ... Rahimi, M. (2023). Salinity stress improves antioxidant potential by modulating physio-biochemical responses in *Moringa oleifera* Lam. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29954-6>
- Babalola, A. ;, Longa, O., Nicola, L., Adedayo, A. A., & Babalola, O. O. (2023). Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. *Journal of Fungi*

- 2023, Vol. 9, Page 239, 9(2), 239. <https://doi.org/10.3390/JOF9020239>
- Bantis, F., Fotelli, M., Ilić, Z. S., & Koukounaras, A. (2020). Physiological and Phytochemical Responses of Spinach Baby Leaves Grown in a PFAL System with LEDs and Saline Nutrient Solution. *Agriculture* 2020, Vol. 10, Page 574, 10(11), 574. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE10110574>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 1973 39:1, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.09.012>
- Bellotti, G., Taskin, E., Guerrieri, M. C., Beone, G. M., Menta, C., Remelli, S., ... Puglisi, E. (2022). Agronomical valorization of eluates from the industrial production of microorganisms: Chemical, microbiological, and ecotoxicological assessment of a novel putative biostimulant. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.907349/FULL>
- Bian, R., Yu, S., Song, X., Yao, J., Zhang, J., & Zhang, Z. (2023). An Integrated Metabolomic and Gene Expression Analysis of ‘Sachinoka’ Strawberry and Its Somaclonal Mutant Reveals Fruit Color and Volatiles Differences. *Plants*, 12(1), 82. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12010082/S1>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bulgari, R., Morgutti, S., Cocetta, G., Negrini, N., Farris, S., Calcante, A., ... Ferrante, A. (2017). Evaluation of borage extracts as potential biostimulant using a phenomic, agronomic, physiological, and biochemical approach. *Frontiers in Plant Science*, 8, 935. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00935/BIBTEX>
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants.



- Plant and Soil*, 383(1–2), 3–41. <https://doi.org/10.1007/S11104-014-2131-8/TABLES/1>
- Chen, Y. H., Lu, P. J., Hulme, C., & Shaw, A. Y. (2013). Synthesis of kojic acid-derived copper-chelating apoptosis inducing agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22(2), 995–1003. <https://doi.org/10.1007/S00044-012-0094-Y>
- Desoky, E. S. M., Elrys, A. S., Mansour, E., Eid, R. S. M., Selem, E., Rady, M. M., ... Semida, W. M. (2021). Application of biostimulants promotes growth and productivity by fortifying the antioxidant machinery and suppressing oxidative stress in faba bean under various abiotic stresses. *Scientia Horticulturae*, 288, 110340. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110340>
- Dhindsa, R. S., Plumb-dhindsa, P., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93–101. <https://doi.org/10.1093/JXB/32.1.93>
- Drobek, M., Fraç, M., & Cybulska, J. (2019). Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review. *Agronomy 2019*, Vol. 9, Page 335, 9(6), 335. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY9060335>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.09.021>
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., & Jačević, V. (2021). The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2106. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.552969/BIBTEX>
- El-Nakhel, C., Cozzolino, E., Ottaiano, L., Petropoulos, S. A., Nocerino, S., Pelosi, M. E., ... Di Mola, I. (2022). Effect of Biostimulant Application on Plant Growth, Chlorophylls and Hydrophilic Antioxidant Activity of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Grown under Saline Stress. *Horticulturae 2022*, Vol. 8, Page 971, 8(10), 971. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8100971>
- Ermis, N., Zare, N., Darabi, R., Alizadeh, M., Karimi, F., Singh, J., ... Baghayeri, M.

- (2023). Recent advantage in electrochemical monitoring of gallic acid and kojic acid: a new perspective in food science. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S11694-023-01881-0/METRICS>
- EUR-Lex - L:2019:170:TOC - ES - EUR-Lex. (n.d.). Retrieved May 11, 2023, from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2019:170:TOC>
- Fan, L., Shi, G., Yang, J., Liu, G., Niu, Z., Ye, W., ... Guan, Q. (2022). A Protective Role of Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Astragalus membranaceus* against Saline-Alkali Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15686. <https://doi.org/10.3390/IJMS232415686/S1>
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., & Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356–370. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2007.12.009>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105(C), 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1)
- Galeano, R. M. S., Franco, D. G., Chaves, P. O., Giannesi, G. C., Masui, D. C., Ruller, R., ... Zanoelo, F. F. (2021). Plant growth promoting potential of endophytic *Aspergillus niger* 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. *Rhizosphere*, 18, 100332. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2021.100332>
- Gedeon, S., Ioannou, A., Balestrini, R., Fotopoulos, V., & Antoniou, C. (2022). Application of Biostimulants in Tomato Plants (*Solanum lycopersicum*) to Enhance Plant Growth and Salt Stress Tolerance. *Plants*, 11(22), 3082. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11223082/S1>
- Ghaderi, N., Hatami, M. reza, Mozafari, A., & Siosehmardeh, A. (2018). Change in antioxidant enzymes activity and some morpho-physiological characteristics of strawberry under long-term salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(5), 833. <https://doi.org/10.1007/S12298-018-0535-2>
- Giordano, M., El-Nakhel, C., Carillo, P., Colla, G., Graziani, G., Di Mola, I., ... Sabatino, L. (2022). Plant-Derived Biostimulants Differentially Modulate Primary and Secondary Metabolites and Improve the Yield Potential of Red and Green Lettuce Cultivars. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 1361, 12(6), 1361.

<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12061361>

- González-Morales, S., Solís-Gaona, S., Valdés-Caballero, M. V., Juárez-Maldonado, A., Loredó-Treviño, A., & Benavides-Mendoza, A. (2021). Transcriptomics of Biostimulation of Plants Under Abiotic Stress. *Frontiers in Genetics*, 12, 36. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2021.583888/BIBTEX>
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., & Tran, L. S. P. (2015). Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9), 1304–1320. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.05.005>
- Hasan, M. M., Ali, M. A., Soliman, M. H., Alqarawi, A. A., Abd\_Allah, E. F., & Fang, X. W. (2020). Insights into 28-homobrassinolide (HBR)-mediated redox homeostasis, AsA–GSH cycle, and methylglyoxal detoxification in soybean under drought-induced oxidative stress. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tjpi*, 15(1), 371–385. <https://doi.org/10.1080/17429145.2020.1832267>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Anee, T. I., & Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(2), 249. <https://doi.org/10.1007/S12298-017-0422-2>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456. <https://doi.org/10.4161/PSB.21949>
- Hernández-Hernández, H., Quiterio-Gutiérrez, T., Cadenas-Pliego, G., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., De La Fuente, M. C., ... Juárez-Maldonado, A. (2019). Impact of Selenium and Copper Nanoparticles on Yield, Antioxidant System, and Fruit Quality of Tomato Plants. *Plants 2019*, Vol. 8, Page 355, 8(10), 355. <https://doi.org/10.3390/PLANTS8100355>
- Hernández-Herrera, R. M., Sánchez-Hernández, C. V., Palmeros-Suárez, P. A., Ocampo-Alvarez, H., Santacruz-Ruvalcaba, F., Meza-Canales, I. D., & Becerril-Espinosa, A. (2022). Seaweed Extract Improves Growth and Productivity of Tomato Plants under Salinity Stress. *Agronomy*, 12(10), 2495. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12102495/S1>
- Hosseinifard, M., Stefaniak, S., Javid, M. G., Soltani, E., Wojtyła, Ł., & Garnczarska, M.

- (2022). Contribution of Exogenous Proline to Abiotic Stresses Tolerance in Plants: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 5186, 23(9), 5186. <https://doi.org/10.3390/IJMS23095186>
- Hussain, S., Shaukat, M., Ashraf, M., Zhu, C., Jin, Q., Zhang, J., ... Zhang, J. (2019). Salinity Stress in Arid and Semi-Arid Climates: Effects and Management in Field Crops. *Climate Change and Agriculture*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.87982>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.AJME.2017.09.001>
- Kesawat, M. S., Satheesh, N., Kherawat, B. S., Kumar, A., Kim, H. U., Chung, S. M., & Kumar, M. (2023). Regulation of Reactive Oxygen Species during Salt Stress in Plants and Their Crosstalk with Other Signaling Molecules—Current Perspectives and Future Directions. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 864, 12(4), 864. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12040864>
- Latique, S., Mrid, R. Ben, Kabach, I., Kchikich, A., Sammama, H., Yasri, A., ... Selmaoui, K. (2021). Foliar Application of *Ulva rigida* Water Extracts Improves Salinity Tolerance in Wheat (*Triticum durum* L.). *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 265, 11(2), 265. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11020265>
- Li, Y., He, N., Hou, J., Xu, L., Liu, C., Zhang, J., ... Wu, X. (2018). Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6(JUN), 64. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2018.00064/BIBTEX>
- Liang, J., Zheng, J., Wu, Z., & Wang, H. (2020). Strawberry FaNAC2 Enhances Tolerance to Abiotic Stress by Regulating Proline Metabolism. *Plants*, 9(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9111417>
- Lu, Y., Zheng, X., Wang, Y., Zhang, L., Wang, L., Lei, Y., ... Sun, J. (2022). Evaluation of *Aspergillus niger* Six Constitutive Strong Promoters by Fluorescent-Auxotrophic Selection Coupled with Flow Cytometry: A Case for Citric Acid Production. *Journal of Fungi*, 8(6), 568. <https://doi.org/10.3390/JOF8060568/S1>
- Munira, S., Hossain, M. M., Zakaria, M., Ahmed, J. U., & Islam, M. M. (2015). Evaluation

- of Potato Varieties against Salinity Stress in Bangladesh. *International Journal of Plant & Soil Science*, 6(2), 73–81. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2015/15879>
- Mutale-joan, C., Rachidi, F., Mohamed, H. A., Mernissi, N. El, Aasfar, A., Barakate, M., ... Arroussi, H. El. (2021). Microalgae-cyanobacteria-based biostimulant effect on salinity tolerance mechanisms, nutrient uptake, and tomato plant growth under salt stress. *Journal of Applied Phycology*, 33(6), 3779–3795. <https://doi.org/10.1007/S10811-021-02559-0/METRICS>
- Naboulsi, I., Mrid, R. Ben, Ennoury, A., Zouaoui, Z., Nhiri, M., Bakrim, W. Ben, ... Aboulmouhajir, A. (2022). Crataegus oxyacantha Extract as a Biostimulant to Enhance Tolerance to Salinity in Tomato Plants. *Plants 2022, Vol. 11, Page 1283*, 11(10), 1283. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11101283>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1987). Purification of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts; Its Inactivation in Ascorbate-Depleted Medium and Reactivation by Monodehydroascorbate Radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1), 131–140. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A077268>
- Niwa, Y., & Akamatsu, H. (1991). Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. *Inflammation*, 15(4), 303–315. <https://doi.org/10.1007/BF00917315>
- Ntanos E, Kekelis P, Assimakopoulou A, Gasparatos D, Denaxa N-K, Tsafouros A, Roussos PA. Amelioration Effects against Salinity Stress in Strawberry by Bentonite–Zeolite Mixture, Glycine Betaine, and Bacillus amyloliquefaciens in Terms of Plant Growth, Nutrient Content, Soil Properties, Yield, and Fruit Quality Characteristics. *Applied Sciences*. 2021; 11(19):8796. <https://doi.org/10.3390/app11198796>
- Packer, L. (2001). Vitamin C: From Molecular Actions to Optimum Intake, 136–165. <https://doi.org/10.1201/9780203904046-13>
- Pillet, J., Chambers, A. H., Barbey, C., Bao, Z., Plotto, A., Bai, J., ... Folta, K. M. (2017). Identification of a methyltransferase catalyzing the final step of methyl anthranilate synthesis in cultivated strawberry. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12870-017-1088-1/FIGURES/8>
- Putri, D. N., Khoatama, A., Perdani, M. S., Utami, T. S., & Hermansyah, H. (2020).

- Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. *Energy Reports*, 6, 331–335. <https://doi.org/10.1016/J.EGYR.2019.08.064>
- Rasheed, F., Markgren, J., Hedenqvist, M., & Johansson, E. (2020). Modeling to Understand Plant Protein Structure-Function Relationships—Implications for Seed Storage Proteins. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040873>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Shabala, S., & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 651–669. doi:10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x
- Saharan, B. S., Brar, B., Duhan, J. S., Kumar, R., Marwaha, S., Rajput, V. D., & Minkina, T. (2022). Molecular and Physiological Mechanisms to Mitigate Abiotic Stress Conditions in Plants. *Life*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/LIFE12101634>
- Saidimoradi, D., Ghaderi, N., & Javadi, T. (2019). Salinity stress mitigation by humic acid application in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 256, 108594. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108594>
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & Van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4–5), 426–435. <https://doi.org/10.1007/S00253-002-1032-6/METRICS>
- Shah, H. M. S., Khan, A. S., & Ali, S. (2017). Pre-storage kojic acid application delays pericarp browning and maintains antioxidant activities of litchi fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 132, 154–161. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2017.06.004>
- Şirin, S., & Aslım, B. (2019). Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Medicinal Chemistry Research*, 28(3), 229–238. <https://doi.org/10.1007/S00044-018-2278-6/METRICS>
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain

- desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154.  
<https://doi.org/10.1007/BF01347224/METRICS>
- Świetek, M., Lu, Y. C., Konefał, R., Ferreira, L. P., Cruz, M. M., Ma, Y. H., & Horák, D. (2019). Scavenging of reactive oxygen species by phenolic compound-modified maghemite nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 10, 1073.  
<https://doi.org/10.3762/BJNANO.10.108>
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M. R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., ... Chinou, I. (2012). Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 48(5), 555–564. <https://doi.org/10.1007/S11627-012-9443-2/TABLES/1>
- Tajdinian, S., Rahmati-Joneidabad, M., & Ghodoum Parizipour, M. H. (2022). Macroalgal treatment to alleviate the strawberry yield loss caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in greenhouse cultivation system. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 647. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.1089553/BIBTEX>
- Talakoub, L., Neuhaus, I. M., & Yu, S. S. (2009). Cosmeceuticals. *Cosmetic Dermatology*, 7–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3143-4.10002-3>
- Todeschini, V., Aitlahmidi, N., Mazzucco, E., Marsano, F., Gosetti, F., Robotti, E., ... Lingua, G. (2018). Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatilome. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1611. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01611/BIBTEX>
- Vassileva, M., Malusà, E., Sas-Paszt, L., Trzcinski, P., Galvez, A., Flor-Peregrin, E., ... Vassilev, N. (2021). Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9061254>
- Vioratti Telles de Moura, O., Luiz Louro Berbara, R., França de Oliveira Torchia, D., Fernanda Oliveira Da Silva, H., Augusto van Tol de Castro, T., Carlos Huertas Tavares, O., ... Calderín García, A. (2023). Humic foliar application as sustainable technology for improving the growth, yield, and abiotic stress protection of agricultural crops. A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.1016/J.JSSAS.2023.05.001>

- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20.  
<https://doi.org/10.1093/MP/SSP106>
- Wang, K., Xu, J., Liu, H., Tang, X., Zhang, N., Li, S., & Si, H. (2023). Role of bZIP Transcription Factors in Plant Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 7893, 24(9), 7893.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS24097893>
- Xiao, M., Li, Z., Zhu, L., Wang, J., Zhang, B., Zheng, F., ... Zhang, Z. (2021). The Multiple Roles of Ascorbate in the Abiotic Stress Response of Plants: Antioxidant, Cofactor, and Regulator. *Frontiers in Plant Science*, 12, 598173.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.598173>
- Xie, H., Ma, Q., Wei, D. Z., & Wang, F. Q. (2018). Transcriptomic analysis of *Aspergillus niger* strains reveals the mechanism underlying high citric acid productivity. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40643-018-0208-6/TABLES/7>
- Xu, L., & Geelen, D. (2018). Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers in Plant Science*, 871, 1567.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01567/BIBTEX>
- Xu, Y., Charles, M. T., Luo, Z., Mimee, B., Tong, Z., Véronneau, P. Y., ... Rolland, D. (2019). Ultraviolet-C priming of strawberry leaves against subsequent *Mycosphaerella fragariae* infection involves the action of reactive oxygen species, plant hormones, and terpenes. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 815–831.  
<https://doi.org/10.1111/PCE.13491>
- Xue, T., Hartikainen, H., & Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil* 2001 237:1, 237(1), 55–61.  
<https://doi.org/10.1023/A:1013369804867>
- Yan, Z., Shi, J., Gao, L., Wang, Q., & Zuo, J. (2020). The combined treatment of broccoli florets with kojic acid and calcium chloride maintains post-harvest quality and inhibits off-odor production. *Scientia Horticulturae*, 262, 109019.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.109019>
- Zhang, H., Li, K., Zhang, X., Dong, C., Ji, H., Ke, R., ... Chen, C. (2020). Effects of ozone treatment on the antioxidant capacity of postharvest strawberry. *RSC Advances*,



10(63), 38142–38157. <https://doi.org/10.1039/D0RA06448C>

- Zhang, J., Chen, H., Chen, M., Wang, H., Wang, Q., Song, X., ... Feng, Z. (2017). Kojic acid-mediated damage responses induce mycelial regeneration in the basidiomycete *Hypsizygus marmoreus*. *PLOS ONE*, 12(11), e0187351. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0187351>
- Zhou, P., Graether, S. P., Hu, L., & Zhang, W. (2023). Editorial: The role of stress proteins in plants under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1545. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1193542>
- Zhu, G. Y., Shi, X. C., Wang, S. Y., Wang, B., & Laborda, P. (2022). Antifungal Mechanism and Efficacy of Kojic Acid for the Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Frontiers in Plant Science*, 13, 845698. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.845698/FULL>
- Zulfiqar, F., Nafees, M., Chen, J., Darras, A., Ferrante, A., Hancock, J. T., ... Siddique, K. H. M. (2022). Chemical priming enhances plant tolerance to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2883. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.946922/BIBTEX>
- Zuzunaga-Rosas, J., González-Orenga, S., Tofei, A. M., Boscaiu, M., Moreno-Ramón, H., Ibáñez-Asensio, S., & Vicente, O. (2022). Effect of a Biostimulant Based on Polyphenols and Glycine Betaine on Tomato Plants's Responses to Salt Stress. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 2142, 12(9), 2142. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12092142>

## CONCLUSIÓN GENERAL

1. La síntesis de ácido kójico pudo ser inducida con la cepa *Aspergillus niger* M4 por medio de la optimización del medio líquido para favorecer la producción de AK mediante la concentración de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, y además el valor de pH adecuado para mejorar la productividad.
2. El uso del extracto de ácido kójico obtenido por la cepa *A. niger* M4, en la calidad postcosecha de frutos de fresa tuvo efectos positivos en la firmeza de los frutos, disminución de la pérdida de peso, y en el índice de color con los tratamientos de 2 mL/L y 8 mL/L de eak, y 0.5% AK. Además, el uso del extracto de ácido kójico, y AK grado reactivo, también aumentó el % de ácido cítrico, SST, la capacidad de eliminación de radicales libres, el contenido de fenoles totales, y la vitamina C, mejorando la apariencia y la calidad nutracéutica de los frutos.
3. El extracto de ácido kójico (*A. niger* M4), aplicado vía foliar en plantas de fresa sin y con estrés salino favoreció la actividad enzimática de SOD, APX, y GPX en hojas de fresa, la aplicación de AK comercial aumentó la actividad enzimática de CAT, y APX, mientras que la aplicación del bioestimulante comercial Phylgreen aumentó la actividad SOD y APX en condiciones de estrés salino. Para la actividad PAL el AK (0.5%) aumentó en condiciones normales, mientras que en condiciones salinas de 10 mM NaCl, y 25 mM NaCl los tratamientos con extracto de ácido kójico aumentaron. Los compuestos antioxidantes no enzimáticos como fenoles totales, flavonoides totales, GSH, vitamina C también estuvieron favorecidos con la aplicación del extracto de ácido kójico bajo condiciones salinas, además de aumentar también el contenido de clorofilas y prolina. Con la aplicación de Phylgreen y AK (0.5%), se favoreció el aumento de fenoles totales, vitamina C, y GSH en condiciones de salinidad. También, la expresión de genes aumentó con aplicación del extracto de ácido kójico, ácido kójico grado reactivo, y el bioestimulante comercial. Además, el eak aumentó el contenido mineral en hojas como K, Ca, Fe, Cu, y Mn.