

Presencia de enzimas y metabolitos secundarios clusters en secuencia ADN de *Aspergillus salvadorensis*¹ en la producción de pigmentos negros naturales.

**Dr. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO,
PhD**

**Profesor de Microbiología, Facultad de
Medicina, Universidad de El Salvador
ORCID. ID <https://orcid.org/0000-0001-5643-8317>**

**Correspondence: Antonio Vásquez,
antonio.vasquez@ues.edu.sv**

Resumen

Objetivo. Determinar por el método Next-Generation Sequencing Illumina identificar los genes relacionados a la pigmentación del hongo en la secuenciación DNA de enzimas y metabolitos secundarios. Así como en determinar las características fenotípicas y genotípicas en general la especie *A. uesalvadorensis*. Metodología. Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, MACROGEN Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios MACROGEN utilizaron los siguientes sistemas: el sistema EggNOG summary: Orthology Frequency within COG (Clusters of Orthologous Groups) Categories en la lectura de secuenciación. MetaCyc: Database offering detailed information on metabolic pathways, enzymes, compounds, and reactions, * UniRef: The UniProt Reference Clusters (UniRef) offer clustered sets of sequences derived from the UniProt Knowledgebase, including isoforms, and selected UniParc records, EggNOG: Relative Abundance in Hierarchical Categories of COG(Clusters of Orthologous Groups) using CPM, KEGG Orthology (KO) y KEGG summary: Orthology Frequency within Main

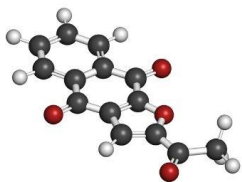
¹ Validation Fungal Name FN 573057: *Aspergillus salvadorensis* Antonio Vásquez Hidalgo 2025-10-17 and GenBank ID PRJNA1306032

and Sub-Categories. DNA-seq. Conclusiones. Se encontraron 14 enzimas y metabolitos secundarios en la producción de pigmentos negros producidos por el hongo por stress oxidativo.

Palabras clave: *Aspergillus salvadorensis*, Macrogen, metabolitos y enzimas.

Introducción

En nuestro medio no es común que un hongo produzca pigmentación de color negro con la presencia de la semilla de nacascal, tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del *Aspergillus salvadorensis*, que al contacto con el tanino de la semilla da el color característico negro o producir el colorante por sus propios medios. La semilla proviene del árbol conocido como nacascal tiene como nombre científico *Caesalpinia coriaria*. Pertenece a la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia* y especie *coriaria* por ser utilizado en la tinción de cueros de piel del ganado vacuno. Es una planta leguminosa con tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo (cada una con más de 10 foliolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro. En estas semillas crece un hongo al cual se denomina *Aspergillus salvadorensis*, sus esporas están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, pigmentadas, de diámetro pequeño, y de color negro. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo antes de las 24 horas al agregar al medio agar saboroud más sustancias oxidantes da el color característico de color negro al interactuar con el hierro o por si solas generar el pigmento ya que contiene metabolitos secundarios. Según el análisis fitoquímico preliminar del árbol de *Caesalpinia coriaria*, contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. **Justificación.** Se realizó inicialmente un estudio completo sobre la extracción e identificación de ADN del género *Aspergillus*

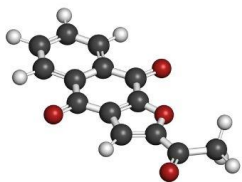


para determinar qué tipo de especies circulan en nuestro país. La investigación comenzó en 2006 con estudios fenotipos en los laboratorios del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, luego en 2008 en los laboratorios de microscopía electrónica de barrido en CENSALUD y luego en México resultados preliminares de PCR molecular, luego en 2024 en los laboratorios de MACROGEN INC en Corea del Sur método Illumina el estudio completo de extracción, cuantificación y secuenciación de g,q,c,ds,seqADN en su análisis molecular del género *Aspergillus* para determinar el tipo de especie autóctona que circulan en la zona norte de nuestro país. Se aclara que los laboratorios de secuenciación proveen datos crudos en general en millones de secuencias, pero hay que alinearlos para determinar la especie ya que según la filogenia puede ser producto de una mutación, delección en sitios conservados positivo, alineación moderada o débil, gaps, utilizando programas como GenBank, Clustal, Megal2, PHYTON y otros. **Objetivo:** Objetivo: Determinar por el método Next-Generation Sequencing identificar los genes relacionados a la pigmentación del hongo en la secuenciación DNA de enzimas y metabolitos secundarios. Así como en determinar las características fenotípicas y genotípicas en general la especie *A. uesalvadorensis*.

Diseño metodológico.

La investigación estuvo compuesta por cuatro fases: Primera fase: Recolección de las semillas de nacascol. Se recolectaron cinco lotes de semillas de *Caesalpinia coriaria* de la zona norte, se realizó purificación y selección de las semillas de acuerdo a su apariencia y color. A continuación, los inóculos se inocularon en placas y tubos de ensayo en medio de cultivo Sabouraud. El crecimiento se observó a las 48 horas en el laboratorio de Microbiología a 40x y 100x en microscopio óptico simple a lo largo de semanas llevando hoja de cotejo. Segunda fase: Extracción y

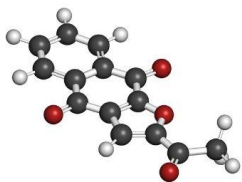
preparación del tanino de la semilla y el hongo. Preparación de la suspensión de esporas y microcultivo. Se preparó una suspensión de esporas a partir de cultivo en donde se identificaron las conidias o esporas en donde se extrajeron por método simple bajo el microscopio y se sembraron de nuevo, la cual se utilizó para realizar los inóculos en el medio de cultivo Sabouraud en tubo y placa, el hongo se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al que previamente se le agregaron 50 ml del medio, se incubó durante 48 hrs a 28 °C. Posteriormente, se añadieron 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y se agitaron cuidadosamente durante 5 min con la ayuda de un agitador magnético. Se paso también al tubo en Sabouraud y se agito para una homogeneización para asegurar que las esporas estén bien suspendidas. Si las esporas tienden a sedimentarse, puede ser útil utilizar un mezclador o agitar manualmente. El recuento de esporas se realizó con una cámara Neubauer para una concentración adecuada se requiera. (1). Se hizo un Micro cultivo preparando en una cámara húmeda estéril: una placa de Petri, en cuyo fondo se coloca agua estéril y una varilla de vidrio en forma de V, sobre ésta se coloca el portaobjeto, y sobre éste el bloque del medio de cultivo Sabouraud. La muestra se inoculo sobre el bloque en cuatro cuadrantes, mediante el asa de platino en forma de L sobre el bloque del medio ya inoculado se coloca una laminilla cubreobjetos e incuba por 7 días a 25°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una lámina con una o dos gotas de Azul Lactofenol y se observa al microscopio con objetivo 100x las estructuras características de la especie aislada. (2) El hongo se aisló a partir de semillas de nacascol de la zona norte. Las semillas café-negras fueron identificadas, recolectadas y almacenadas en bolsas herméticas para su posterior análisis a temperatura ambiente, siendo en su mayoría de color negro. No requiere medidas especiales para su transporte y conservación. En el material vegetal no se utilizó la limpieza de semillas. Se raspó y el material se retiró y se depositó en medios de cultivo ASD (agar



dextrosa Sabouraud) para su aislamiento y diferenciación. Tercera fase: Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inoculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud para cultivo. Las placas y tubos de cultivo se incubaron a temperatura durante una semana. Este proceso se repitió hasta obtener aislados puros. Las muestras previamente aisladas se inocularon en 150 ml de medio de cultivo líquido PW (peptona, agua y caldo de nutrientes) en placa y tubos y se incubaron a 37 °C en 48 horas y a temperatura ambiente entre 20 y 25 °C. La biomasa se secó a 42 °C durante dos días y se dejó a temperatura ambiente a 25 °C durante 3 semanas hasta su posterior análisis.

Caracterización morfológica de muestras fúngicas. Se realizó en cultivos en Saboraud y se incubó a 37°C durante 72 horas en tubos aeróbicos y luego a temperatura ambiente x 7 días. Con simple observación microscópica sobre lactofenol azul de algodón a 10 x, 40 x y 100x, y luego sellado con un cubreobjetos. La visualización de las estructuras se realizó bajo un microscopio óptico. Se utilizó la afiliación taxonómica para determinar la base de datos en línea. Método de ADN. En general, se utilizaron métodos para la secuenciación del ADN. En la cuarta fase, Caracterización molecular. Se hizo la identificación por medio de la secuenciación los metabolitos secundarios encontrados en la cadena DNA, proporcionados por MACROGEN INC 2025 Corea del Sur, así como el resultado de enzimas, proteínas y metabolitos secundarios del hongo *A. uesalvadorensis*. El preparado consistió en tres muestras, una cepa pura en tubo de vidrio y dos muestras más, una muestra era ADN y la otra simple, fueron enviadas a Corea del Sur en los laboratorios de MACROGEN INC para la extracción, análisis e identificación de g,q,c,ds,seqDNA. Se utilizó el método de secuenciación de Sanger mediante el método de terminación de la cadena enzimática y la secuenciación automática. La secuenciación se lleva a cabo en tres pasos: 1. Realizar la síntesis de nuevos fragmentos de ADN. 2. Separar los fragmentos por electroforesis y finalmente 3. Identificar nucleótidos para

determinar la secuencia. En términos de microbiología, el estudio molecular se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que han sido previamente amplificados, o secuenciando todo el ADN previamente fragmentado al azar del hongo. La secuenciación a través de *Illumina* se caracteriza básicamente por la ejecución de los siguientes procesos: a. La amplificación de fragmentos de ADN para la generación de clusters (colonias de un mismo fragmento) se realiza mediante el método PCR bridge. b. La detección de bases en la secuenciación se realiza a través de marcadores fluorescentes. Por lo tanto, la plataforma Illumina permite la secuenciación de fragmentos de ADN en ambos extremos. El fragmento se secuencia amplificado por ambos extremos en lugar de un solo extremo. Incluyendo ADNg, qDNA, dsDNA, cDNA y seqDNA y luego analizarlos en paquetes de computadora de alta capacidad. ⁽³⁾ 6. Extracción de ADNg. Los genes de ADNg son actualmente una de las formas más estudiadas en el genoma fúngico, principalmente para la detección e identificación de especies a través de la biología molecular. En la preparación de la muestra anterior y su método de extracción tiene como objetivo principal que debe liberar el ADN intracelular, rompiendo la pared de la célula fúngica o micelio, la membrana celular y la membrana nuclear por calor a temperatura controlada por el termociclador u otra vía. Además, debe concentrar las moléculas diana de ADN que puedan estar presentes en pequeñas cantidades y debe purificarse eliminando trazas de contaminantes, proteínas, restos de ARN extraño, sin degradar el ácido nucleico. Para la ruptura de células fúngicas se puede realizar por diferentes métodos: como químico, enzimático o mecánico ⁽⁴⁾, que son los más comunes, pero dependerá del laboratorio en su método de extracción. 7. Técnica qPCR. Llamado ADN cuantitativo medido por fluorimetría que captura nucleótidos. Después de haber cumplido con los requisitos para la extracción de ADNg en el control de calidad, el ADNc se fragmentó y cuantificó degradándolo. El método de control de



calidad del ADN en MACROGEN fue: 1. Cantidad de ADN: Realizado por el método QuantiFluor® dsDNA System utilizando el lector de microplacas multimodo Victor Nivo. MacroGen cuantifica el material genómico de partida mediante la cuantificación basada en fluorescencia. utilizando tintes específicos de ADN bicatenario, este método cuantifica el dsDNA con mayor precisión que el espectrómetro UV, incluso en presencia de contaminantes comunes. Las especies del género *Aspergillus spp* en su evolución genómica han sido variables en su tamaño, en el que tienen un rango promedio de tamaño de genoma de 27 a 39 Mb o más y un número promedio de genes entre 9000 a 14000 genes. El que tiene el tamaño más grande es *A. sojae* 39.5 MB y el que tiene el mayor número de genes es *A.niger* con 14,165 MB. [5-8] 8. Calidad por ciclo. El término Calidad por Ciclo se refiere a la evaluación de la calidad de las lecturas de secuenciación en función de cada ciclo de secuenciación. El proceso de secuenciación se lleva a cabo en ciclos. Durante cada ciclo, se agrega una base al fragmento de ADN y se detecta la base incrustada. Se secuencian base por base en una serie de ciclos. En cada ciclo, se incorpora una base (A, T, C o G) a la cadena de ADN y un fluoróforo o señal óptica detecta la base agregada. Este proceso se repite varias veces, y en cada ciclo se detecta y registra de forma específica. (MacroGen, 2024). Para la identificación de genes clusters en enzimas, proteínas y metabolitos secundarios MACROGEN utilizaron los siguientes sistemas: el sistema EggNOG summary: Orthology Frequency within COG (Clusters of Orthologous Groups) Categories en la lectura de secuenciación. MetaCyc: Database offering detailed information on metabolic pathways, enzymes, compounds, and reactions, * UniRef: The UniProt Reference Clusters (UniRef) offer clustered sets of sequences derived from the UniProt Knowledgebase, including isoforms, and selected UniParc records, EggNOG: Relative Abundance in Hierarchical

Categories of COG(Clusters of Orthologous Groups) using CPM, KEGG Orthology (KO) y KEGG summary: Orthology Frequency within Main and Sub-Categories.

Resultados.

La caracterización morfológica y genotípica del hongo se caracteriza en resumen así: **Características macroscópicas:** colonia en agar saboraud es de color blanco, luego cambia a verde y después se hace negro, el reverso del bisel pigmentado de color, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento húmeda de color negro. **Características Microscópicas:** Esterigmas. La cabeza de la conidia es negra, conidióforo rugoso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas abundantes de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro, las cabezas conidiales lisas de una pared redonda e irregular, dispuesta en forma de cadenas uniseriadas; estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro; la vesícula o columella; hay conidias abundantes; tiene una hilera de fiálides de donde emergen las conidias. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas formando espículas en número mayor de diez. La conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una coraza sólida que no tiñe con lactofenol azul algodón. Las esporas inmaduras asexuales son esféricas de pared delgada, incolora, de tamaño grande que se encuentran en el conidióforo en la que están próxima al pie son inmaduras y luego al final llegan a la vesícula son maduras y bajo presión son expulsadas hacia afuera en las fiálides.

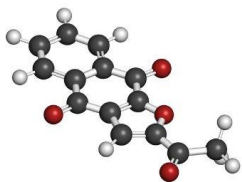


Photo 1. Seed & culture Agar
Aspergillus salvadorensis

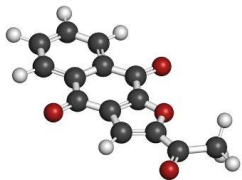
Laboratory Microbiology UES

Foto 1. Cultivo en placa y tubo de *Aspergillus salvadorensis*.

En la Foto 1 Se observa que el *Aspergillus salvadorensis* cultivado en Agar Sabouraud (SDA) se vuelve negro, lo que es una fuerte evidencia de la producción de melanina. La diapositiva describe las características macroscópicas de la colonia de *A. salvadorensis* de la siguiente manera: Color de la colonia en Agar Sabouraud: es de color blanco luego cambia a verde y después se hace negro. Reverso de la colonia: pigmentado de color negro. Aspecto de la colonia: "es polvorienta de color negro". Las imágenes de las placas de Petri y el cultivo en tubo también confirman esta coloración oscura. En micología, esta transición a un color negro o marrón muy oscuro en la colonia o el reverso es el indicativo fenotípico más importante de la producción de melanina (un pigmento oscuro y protector) o de compuestos similares a la melanina. Por lo tanto, a diferencia de muchas especies de *Aspergillus* que son de color amarillo o verde claro. *A. salvadorensis* sí produce un pigmento oscuro (melanina) que se acumula en los conidios y el micelio a medida que madura la colonia.

Extracción del colorante en condiciones experimentales.

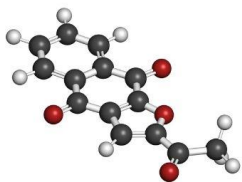
La extracción del colorante negro, generalmente melanina, producido por el hongo *Aspergillus* en condiciones de laboratorio es un procedimiento metódico que se inicia con el cultivo del microorganismo. Dado que este pigmento es inherentemente insoluble en muchos solventes, se requieren pasos específicos para su manejo y tratamiento. El proceso comienza con el Cultivo de *Aspergillus*, donde el hongo se siembra en un medio Agar Sabouraud, el cual aporta los nutrientes esenciales como fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (peptonas o sales). El cultivo se desarrolla en condiciones controladas, a una temperatura ambiente o ligeramente superior (aproximadamente 25–30°C) y con alta humedad. Este entorno estimula la producción de grandes cantidades de melanina, especialmente si el hongo se somete a factores de estrés ambiental como cambios de pH o radiación UV. Una vez que el hongo ha crecido y sintetizado la melanina en el medio, se procede a la Recolección y Preparación de la Biomasa. La biomasa de *Aspergillus*, que contiene el pigmento, se separa del medio de cultivo líquido mediante métodos como la centrifugación o la filtración. Esta biomasa fúngica debe lavarse con agua destilada para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo que pudiera interferir con la extracción. Opcionalmente, se puede secar la biomasa a baja temperatura (40-50°C) en un horno para facilitar la etapa de extracción. La Extracción de la Melanina es el paso crucial debido a la



insolubilidad del pigmento. El método más común se basa en la solubilidad de la melanina en soluciones alcalinas. La biomasa se mezcla con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 1-2% y se calienta suavemente (a unos 60-80°C) durante varias horas. Esto permite que la melanina se disuelva en el álcali. La solución resultante se filtra para separar la biomasa insoluble, y el filtrado, que contiene el pigmento disuelto, se neutraliza con un ácido como ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar un pH cercano a 7. Esta acidificación provoca la precipitación de la melanina, la cual se recupera posteriormente por filtración y se seca. Alternativamente, se pueden emplear otros métodos de extracción. Si la extracción alcalina es insuficiente, se pueden usar disolventes orgánicos como etanol o metanol; en este caso, la biomasa se mezcla con el solvente, se agita con un ligero calentamiento, y el pigmento se filtra, dejando que el disolvente se evapore para obtener la melanina seca. También, en ocasiones, se utiliza ácido clorhídrico concentrado junto con calentamiento para disolver y extraer la melanina, la cual se precipita y separa después. Después de la extracción, la melanina puede someterse a una Purificación del Pigmento. Dependiendo del nivel de pureza requerido para su uso final, se pueden aplicar técnicas como la precipitación adicional, la diálisis para eliminar impurezas y otros metabolitos fúngicos, o la cromatografía en columna. Finalmente, el pigmento extraído y purificado pasa por el Secado y Almacenamiento. Se obtiene un polvo seco de melanina utilizando un liofilizador o un horno a baja temperatura (40-50°C). Este pigmento seco debe almacenarse en condiciones de oscuridad y sequedad para prevenir su descomposición o pérdida de color debido a la exposición a la luz o la humedad. En resumen, el protocolo de extracción de melanina de *Aspergillus* implica el cultivo controlado del hongo, la recolección de la biomasa y, predominantemente, la extracción del pigmento mediante el uso de soluciones alcalinas (NaOH), aunque se pueden emplear otros solventes como etanol o metanol. El proceso concluye con la purificación, secado y almacenamiento del colorante, pasos que pueden ajustarse para optimizar

la extracción según las necesidades de aplicación.

Características genotípicas: Informe de secuenciación genómica (Shotgun Metagenomic Sequencing Report): Este informe está formado por: Estadística de datos sin procesar. (Raw Data Statistics.). El apartado consta de: A. Flujo de trabajo experimental. Macrogen. Las muestras se preparan según el flujo de trabajo de preparación de la biblioteca NGS y se secuencian utilizando la plataforma Illumina. El proceso puede diferir en función del protocolo de preparación de la biblioteca que se siga. Así por ejemplo: Preparación de la muestra. Primero se extrae el ADN/ARN de la muestra, y las muestras que cumplen con los estándares de control de calidad proceden a la construcción de la biblioteca. Adaptadores Ligate. La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida de una ligadura de adaptador 5' y 3'. Alternativamente, la marcación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso, lo que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. Construcción final de la biblioteca. A continuación, los fragmentos ligados al adaptador se amplifican por PCR con una solución de cebador de PCR que se recogen en los extremos de cada adaptador. Las plantillas de la biblioteca se someten a un proceso de control de calidad y cuantificación. Generación de clústeres mediante amplificación de puentes. La biblioteca se carga en una celda de flujo donde los fragmentos se capturan en un césped de oligonucleótidos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de la biblioteca. A continuación, cada fragmento se amplifica en distintos grupos clonales a través de la amplificación de puente. Una vez completada la generación del clúster, las plantillas están listas para la secuenciación. Tecnología de secuenciación por síntesis (SBS). La tecnología SBS de Illumina utiliza un método patentado basado en terminadores reversibles que detecta bases individuales a medida que se incorporan a las hebras de



ADN molduras. Dado que todos los dNTP 4 reversibles unidos a terminadores están presentes durante cada ciclo de secuenciación, la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de error bruto en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base por base de alta precisión que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de secuencia, incluso dentro de regiones de secuencia repetitiva y homopolímeros. Química de cuatro, dos y un canal. Los sistemas que utilizan la química de cuatro canales utilizan una mezcla de nucleótidos marcados con cuatro tintes fluorescentes diferentes. De manera similar, la química de dos canales utiliza dos tintes fluorescentes diferentes, y la química de un canal usa solo un colorante. Las imágenes son procesadas por un software de análisis de imágenes para determinar la identidad de los nucleótidos. Generación de datos brutos. El secuenciador Illumina genera imágenes en bruto utilizando el software de control de secuenciación para el control del sistema y la llamada base, a través de un software de análisis primario integrado llamado RTA (análisis en tiempo real). Los archivos binarios BCL/cBCL (llamada base) se convierten en archivos FASTQ utilizando bcl-convert, que es un paquete proporcionado por Illumina. Los adaptadores no se recortan lejos de las lecturas.

Metabolitos en secuenciación identificados.

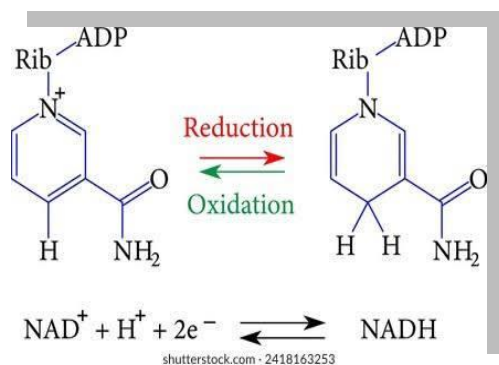
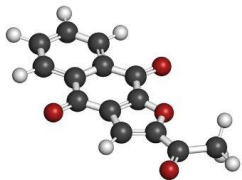


Fig 1. Molécula de NADH.

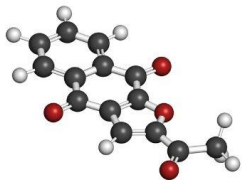
Fuente: Tomado de Shutterstock con el ID 2418163253.free 2025

El Complejo I, también llamado NADH deshidrogenasa, es el complejo enzimático más grande de la cadena respiratoria. Su forma de "L" consta de dos partes principales: un dominio hidrofílico que se adentra en la matriz mitocondrial y se encarga de recibir los electrones del NADH, y un dominio transmembrana anclado en la membrana interna mitocondrial que contiene cerca de 60 hélices. En el interior de esta estructura se encuentran varios grupos que facilitan el transporte de electrones. El primero es el FMN (flavina mononucleótido), que acepta los electrones del NADH. A continuación, una serie de centros de hierro-azufre (Fe-S), ocho en mamíferos, transportan estos electrones hasta la ubiquinona (coenzima Q). Este flujo de electrones libera energía, la cual es utilizada para bombear protones desde la matriz al espacio intermembrana, creando así un gradiente electroquímico esencial para la síntesis de ATP. Producción de Pigmentos en Hongos *Aspergillus*. Varias especies de hongos del género *Aspergillus* producen pigmentos como metabolitos secundarios. ⁽⁵⁾ Este proceso suele activarse como respuesta a la falta de nutrientes o a condiciones de estrés ambiental. La síntesis de estos pigmentos se lleva a cabo principalmente a través de las vías metabólicas del policétido y del siquimato. La producción de pigmentos está muy ligada a la formación de esporas asexuales (conidios), que son las estructuras que contienen el color. El género *Aspergillus* genera una amplia gama de colores, incluyendo amarillos, anaranjados, rojos, marrones y negros. Un ejemplo destacado son las melaninas, pigmentos oscuros producidos por especies como *A. niger* y *A. fumigatus*. Estas melaninas cumplen una función protectora, defendiendo al hongo de los daños causados por la radiación UV y los radicales libres ⁽⁶⁾. Además, en hongos patógenos, las melaninas ayudan a evadir el sistema inmunológico del huésped, lo que aumenta su capacidad de causar enfermedades. Producción de pigmentos en *Aspergillus salvadorensis* y su relación con el metabolismo. La especie de hongo *Aspergillus uesalvadorensis* también es productora de pigmentos, como lo evidencia



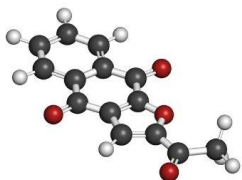
la observación de lotes de semillas de color negro. La aspergilina, un tipo de pigmento producido por este hongo, puede manifestarse en tonos negros o verde negruzco dependiendo de diversos factores.⁽⁶⁾ Estos factores incluyen la especie específica de *Aspergillus*, así como las condiciones ambientales como la nutrición, el pH, la temperatura y la presencia de otros compuestos. Además de los pigmentos oscuros, varias especies de *Aspergillus* producen antraquinonas, las cuales poseen propiedades biológicas como efectos antimicrobianos y antioxidantes. Usos y contribución indirecta de la NADH deshidrogenasa. Los pigmentos fúngicos tienen una variedad de aplicaciones en biotecnología. Son utilizados como colorantes naturales en alimentos, bebidas y otras industrias como la textil y la cosmética. Adicionalmente, muchos de estos pigmentos tienen propiedades bioactivas, como actividad antioxidante, antimicrobiana y anticancerígena, lo que los hace de gran interés para la industria farmacéutica. Aunque la NADH deshidrogenasa no produce pigmentos directamente, su contribución es indirecta pero crucial. Esta enzima, también conocida como complejo I, tiene dos funciones principales: Producción de energía (ATP): Su función principal es generar la energía necesaria para todos los procesos metabólicos del hongo, incluyendo la síntesis de pigmentos.^(5,7) Regulación del estrés oxidativo: *Aspergillus* posee versiones alternativas de esta enzima que ayudan a mantener el equilibrio redox y a controlar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), protegiendo al hongo del estrés ambiental. La producción de melanina puede ser una respuesta complementaria a este mecanismo de protección. Regulación genética de la producción de pigmentos. La producción de pigmentos en *Aspergillus* es un proceso complejo regulado por la interacción de factores genéticos y metabólicos que responden a las condiciones del entorno. Los genes responsables de la producción de pigmentos suelen estar agrupados y su expresión es controlada por factores de transcripción. Un ejemplo clave de esto son

los genes de la policétido sintasa (PKS), que participan en la síntesis de pigmentos como la **aspergilina** a través de rutas metabólicas específicas. Síntesis y Regulación de Pigmentos en *Aspergillus*.^(8,9,10) La mayoría de los pigmentos en el hongo *Aspergillus*, como la melanina DHN (dihidroxi-naftaleno), son policétidos. Su producción comienza con enzimas conocidas como PKS (policétido sintasas), las cuales unen unidades de acetyl-CoA y malonil-CoA. Factores que controlan la producción de pigmentos. La producción de pigmentos está controlada por una interacción compleja entre factores genéticos y metabólicos: Factores Genéticos. Genes de la vía de la DHN-melanina: En algunas especies de *Aspergillus*, los genes para la producción de melanina DHN están agrupados en el genoma. Estos genes contienen las instrucciones para las enzimas que transforman precursores simples en el pigmento final. Genes reguladores: Existen factores de transcripción, como los genes *brlA* y *wA* en *Aspergillus nidulans*, que controlan la expresión de los genes de pigmentos. Por ejemplo, el gen *wA* en esta especie es responsable de cambiar el color de un pigmento de amarillo a verde. Factores Metabólicos y Ambientales. La producción de pigmentos es un proceso metabólico secundario que se activa bajo condiciones específicas, principalmente cuando los nutrientes principales se agotan. Disponibilidad de sustratos: La abundancia de los precursores metabólicos (acetyl-CoA y malonil-CoA) influye directamente en la cantidad de pigmento que se produce.^(11,12) Por ejemplo, el nacascol, al ser una fuente rica en carbohidratos, lípidos y proteínas, es un sustrato ideal para el *Aspergillus salvadorensis*. Estrés ambiental: La pigmentación, especialmente la melanina, actúa como una protección contra diversas formas de estrés, como: Estrés oxidativo: Los pigmentos funcionan como antioxidantes, neutralizando las especies reactivas de oxígeno. Radiación UV: La melanina absorbe la radiación UV, protegiendo el ADN de las esporas del daño. Metales pesados: Algunas especies de *Aspergillus* pueden modificar su pigmentación en respuesta a la presencia de



metales pesados. Diferenciación Celular y Regulación por Estrés. La producción de pigmentos está estrechamente relacionada con la conidiación (formación de esporas), un proceso de diferenciación celular. La pigmentación de las esporas les confiere una mayor resistencia para sobrevivir en entornos hostiles. La regulación de este proceso es un mecanismo de defensa: las señales de estrés ambiental activan los factores de transcripción genéticos, lo que a su vez pone en marcha la producción de pigmentos. El agotamiento de nutrientes desencadena cambios metabólicos en los hongos, redirigiendo su energía del crecimiento hacia la producción de metabolitos secundarios, como los pigmentos. Este mecanismo de supervivencia prepara al organismo para la dispersión. ⁽¹³⁾ Uso de la Secuenciación Genética para el Análisis Metabólico. La secuenciación de ADN (como la proporcionada por MACROGEN) es una herramienta poderosa para predecir las rutas metabólicas y los genes implicados en la biosíntesis de estos metabolitos. Una vez que se obtiene la secuencia del genoma, se pueden usar herramientas bioinformáticas y bases de datos como KEGG y MetaCyc para mapear las rutas metabólicas y asociarlas con genes específicos. Ruta de melanina: Identificar genes de enzimas como la tirosinasa o la laccasa puede indicar que el organismo es capaz de producir melaninas. Ruta de antraquinonas: La secuenciación de genes de oxigenasas, hidroxilasas y transferasas puede sugerir la capacidad del hongo para sintetizar antraquinonas. Análisis de la Expresión Génica con DNA-seq. ^(14,15) Además de la secuenciación de ADN, la técnica DNA-seq es útil para estudiar la expresión de genes. Permite identificar cuáles genes están activos bajo ciertas condiciones, como la escasez de nutrientes o la exposición a factores ambientales que estimulan la producción de pigmentos. Por ejemplo, si un hongo como *Aspergillus* produce melanina en un ambiente determinado, los genes relacionados con la melanina se expresarán en mayor cantidad, lo cual puede detectarse en un análisis de DNA-seq. Predictores de Secuencia y Enzimas Específicas. La secuenciación genética

también permite predecir la existencia de enzimas específicas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Polifenol oxidasa: En algunos hongos, esta enzima puede estar implicada en la formación de melaninas. Su gen puede ser identificado a partir de la secuencia genética. Laccasa: Esta enzima también puede ser identificada a partir de su secuencia genética, y su presencia está vinculada a la producción de ciertos pigmentos. En muchos hongos, la laccasa juega un papel importante en la formación de pigmentos oscuros. La identificación de genes que codifican para laccasas a partir de la secuenciación sería un buen indicativo de la producción de pigmentos como la melanina. ⁽¹⁶⁾ En nuestro caso no se estudiaron. La vía de deshidrogenasa juega un papel crucial en muchos procesos metabólicos dentro de las células, incluidos aquellos relacionados con la producción de metabolitos secundarios. ⁽¹⁷⁾ Aunque no está directamente vinculada a la síntesis de pigmentos como las melaninas, la actividad de las deshidrogenasas (enzimas que catalizan reacciones de deshidrogenación, es decir, la eliminación de átomos de hidrógeno) tiene implicaciones indirectas en la generación de metabolitos secundarios que pueden influir en la coloración de los hongos, como *Aspergillus*. En general estas deshidrogenasas son un grupo de enzimas que catalizan la oxidación de sustratos, lo que implica la transferencia de electrones de una molécula a un aceptor de electrones, generalmente NAD^+ o NADP^+ , convirtiéndolos en sus formas reducidas, NADH o NADPH . Este proceso es esencial para la respiración celular, la biosíntesis de compuestos y las reacciones redox de los metabolitos. Su Rol en la producción de metabolitos secundarios. La producción de pigmentos o metabolitos secundarios en *Aspergillus*, las deshidrogenasas pueden tener un rol indirecto pero fundamental, debido a su participación en reacciones de oxidación y reducción que proporcionan los precursores o activan las rutas metabólicas que producen pigmentos como melaninas o antraquinonas. En general la vía de deshidrogenasa es clave para la biosíntesis de varios metabolitos secundarios, ya que contribuye a la producción de NADH o



NADPH, ^(18,19) que son esenciales para las reacciones redox que transforman precursores en metabolitos finales.

Aunque no es directamente responsable de la coloración (como las melaninas o las aflatoxinas), las deshidrogenasas facilitan las reacciones de oxidación-reducción necesarias para la formación de estos pigmentos y otros compuestos que pueden afectar la coloración del hongo. En resumen, las deshidrogenasas son esenciales para activar o impulsar las rutas metabólicas que conducen a la síntesis de pigmentos, aunque no sean los responsables directos de la pigmentación. ^(20,21,22,23,24) Del análisis de la secuenciación de metabolitos productores de pigmentos, de la secuenciación se encontraron 6 metabolitos productores de pigmento originados por el hongo *Aspergillus uesalvadorensis*, que son:

Tabla I. Enzimas reducción de NADPH y la oxidación de NADH

| |
|--|
| NADPH-ferrihemoprotein reductase |
| NADH-quinone oxidoreductase subunit A [EC:1.6.5.3] |
| NADH-quinone oxidoreductase subunit B [EC:1.6.5.3] |
| NADH-quinone oxidoreductase subunit C [EC:1.6.5.3] |
| NADH-quinone oxidoreductase subunit D [EC:1.6.5.3] |
| NADH-quinone oxidoreductase subunit F [EC:1.6.5.3] |

Fuente: MACROGEN KOREA DEL SUR. EggNOG , MetaCyc . 2025

En la Tabla I. Este texto describe el papel indirecto pero crucial de dos enzimas, la NADPH-ferrihemoprotein reductase y la NADH-quinone oxidoreductase (con sus subunidades), en la producción de pigmentos en hongos como *Aspergillus salvadorensis*. Resumen del Papel Enzimático en la Pigmentación. Las enzimas mencionadas no sintetizan pigmentos directamente, sino que actúan como facilitadoras esenciales al participar en el metabolismo redox (reacciones de oxidación-reducción) de la célula. 1. NADPH-ferrihemoprotein reductase. Función Principal: Cataliza la reducción de ferrihemoproteínas utilizando NADPH. Implicación en Pigmentación: Contribuye a

los procesos metabólicos generales que requieren transferencia de electrones, lo cual es un prerrequisito para la biosíntesis de muchos compuestos, incluidos los pigmentos.

2. NADH-quinone oxidoreductase (Subunidades A, B, C, D, F). Función Principal: Cataliza la transferencia de electrones desde NADH a una quinona, siendo una parte clave de la cadena de transporte de electrones para la respiración celular y la generación de energía. Implicación en Pigmentación: Indirecta: Su actividad en el equilibrio redox celular es fundamental para las reacciones que conducen a la síntesis de metabolitos secundarios, como las melaninas y otros compuestos fenólicos (que suelen ser pigmentos). Manejo de Electrones: Están implicadas en la oxidación-reducción de compuestos intermediarios necesarios para la biosíntesis de pigmentos. Implicación en la Producción de Pigmentos. La producción de pigmentos oscuros en el hongo *Aspergillus uesalvadorensis*, probablemente melaninas, depende de una serie de reacciones redox. Rol del NADH/NADPH: Las enzimas son vitales porque gestionan la generación y el uso de NADH y NADPH. Estos compuestos son cofactores de transferencia de electrones cruciales en la formación de productos como las melaninas. Facilitación de la Biosíntesis: En el caso de la melanina, las deshidrogenasas (como las NADH-quinona oxidoreductasas) ayudan a mantener el equilibrio redox que permite la oxidación de precursores fenólicos (como la tirosina) hasta llegar a intermediarios complejos como la dopaquinona, que eventualmente forman la melanina. En esencia, estas enzimas son vitales para el ecosistema químico de la célula, creando el ambiente redox necesario para que las enzimas pigmentarias directas puedan llevar a cabo su trabajo.

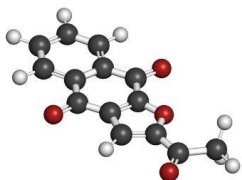
Tabla II. Enzimas reducción de NADPH y la oxidación de NADH

NADH-quinone oxidoreductase subunit G

NADH-quinone oxidoreductase subunit H

NADH-quinone oxidoreductase subunit I

Urate oxidase, dihydrolipoamide



dehydrogenase

FMN-dependent NADH-azoreductase

COGO431 Nadp dependent fmn reductase

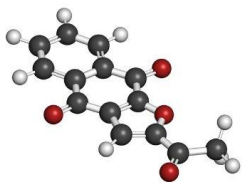
COGO655 Nad dependent fmn reductase

NADP oxidoreductase, coenzyme f420-dependent

Fuente: MACROGEN KOREA DEL SUR. EggNOG , MetaCyc . 2025

En la Tabla II. Función y Significado de la NADH-Quinona Oxidorreductasa. La enzima NADH-quinona oxidoreductasa (o NADH deshidrogenasa), clasificada con el número EC:1.6.5.3, es un complejo proteico crucial. Identificación del Complejo Enzimático. El complejo está formado por múltiples componentes llamados subunidades (identificadas con códigos K como A, B, C, D y F). El hecho de que todas las subunidades compartan el mismo número EC (EC:1.6.5.3) confirma que todas forman parte del mismo complejo que cataliza la misma reacción general. Esta enzima es una oxidoreductasa, es decir, maneja las reacciones de oxidación-reducción, actuando específicamente sobre grupos NADH y utilizando una quinona como aceptor de electrones. Rol Indirecto en la Producción de Pigmentos. Aunque la NADH-quinona oxidoreductasa no es la enzima que sintetiza directamente el pigmento, desempeña un papel crucial e indirecto en la producción de pigmentos, ⁽²⁵⁾ especialmente en hongos como el *Aspergillus salvadorensis*. Equilibrio Redox. El Complejo I es la principal función del hongo, siendo fundamental para la respiración celular y la generación de energía. Sin él, la célula no tendría la energía (ATP) ni la estabilidad química (homeostasis redox) necesarias para llevar a cabo rutas metabólicas costosas como la pigmento génesis (producción de pigmentos). Interacción con Precursores de Pigmentos. En hongos, esta enzima o similares (como las NADPH-quinona oxidoreductasas) pueden participar en el ciclo redox de quinonas, que son moléculas que actúan como precursores o

subproductos de la biosíntesis de pigmentos. Existe una interacción bioquímica directa: algunos pigmentos quinónicos pueden incluso actuar como oxidantes o inhibidores del Complejo I, demostrando un vínculo estrecho entre el metabolismo energético y los pigmentos. En el caso del *A. salvadorensis* negro (probablemente melanina), el NADH/NADPH que manejan estas enzimas es esencial para la reducción de compuestos intermedios que finalmente se convierten en esos pigmentos oscuros. La Melanina DHN: El Escudo Protector Negro. El color negro o gris-verdoso de las esporas de *Aspergillus* se debe casi totalmente a la DHN-Melanina (1,8-dihidroxi-naftalina-melanina), un polímero final de color negro. Síntesis y Función Principal. Composición: La DHN-Melanina es un pigmento derivado de la vía de los policétidos, que son los precursores químicos. Enzima Clave: La enzima PksP (Policétido Sintasa) es la responsable de iniciar la síntesis del precursor principal (un heptacétido). Función: Este pigmento se deposita en la pared celular de las esporas, actuando esencialmente como un escudo protector para la supervivencia del hongo. Inducción por Estrés. El Disparador: La producción de melanina no es constante, sino que se induce (se activa) cuando el hongo se enfrenta a condiciones de estrés, especialmente el estrés oxidativo (causado por la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno o ROS, como los radicales libres). ⁽²⁶⁾ Mecanismo: La acumulación de ROS actúa como una señal celular crucial, activando los genes que permiten al hongo construir la maquinaria defensiva de melanina para sobrevivir. La Conexión con la Energía Celular (NDH). Aunque la enzima NADH-quinona oxidoreductasa (NDH), o Complejo I, no produce la melanina directamente, es fundamental para que la síntesis ocurra: La NDH es esencial porque genera la energía (ATP) y mantiene el equilibrio metabólico necesario. Sin la energía y la homeostasis que proporciona la NDH, la maquinaria enzimática de la DHN-melanina (como la PksP) no podría operar ni construir las defensas pigmentadas, lo que podría llevar a la muerte del hongo. En resumen, el estrés



activa la maquinaria de la melanina, pero la NDH le proporciona el combustible para funcionar. ^(27,28,29,30)

Identificación de molécula del *Aspergillus salvadorensis*.

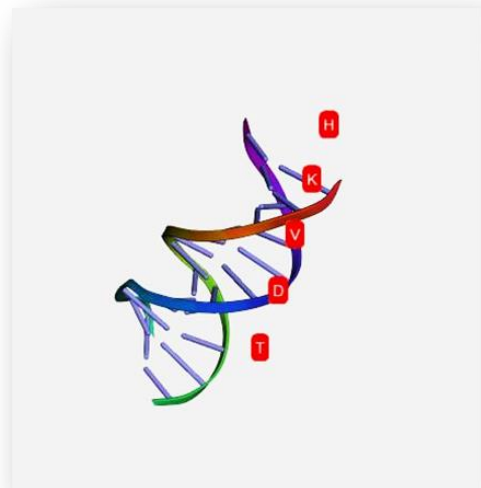


Fig.2.

molécula

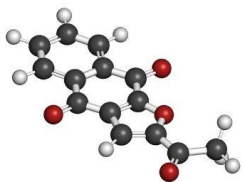
DNA de *Aspergillus salvadorensis*. AI.2025

En la Fig 2 se observan Codones (3 bases) y los Aminoácidos (una letra) del *Aspergillus salvadorensis*. La imagen muestra una estructura tridimensional (3D) de un ácido nucleico, probablemente ADN o ARN. Se observa una doble hélice (lo cual es típico del ADN o ARN de doble cadena), y un gradiente de color arcoíris a lo largo de la cadena, que normalmente indica la dirección de la molécula (de 5' a 3'). Además, hay letras rojas (T, D, V, K, H) marcando ciertas posiciones específicas de la molécula. En estos no se encuentran los precursores cancerígenos en el hongo.

Discusión

El estudio inicial del hongo *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por el biólogo italiano **Antonio Micheli** en su obra *Nova Plantarum* quien nació en Florencia,

Italia, en 1697 ⁽³¹⁾. En la actualidad, ha generado mucho interés no solo por sus implicaciones en la salud sino también en las industrias alimentaria, química y biológica. Se inician investigaciones generales sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio a nivel nacional conocida como la semilla de Nacascal, muy utilizada en alfarería y curtido de pieles en la zona norte del país. Esta semilla tiene una particularidad inerte que necesita de la presencia de un hongo del género *Aspergillus sp* y el hongo devora la semilla como sustrato alimenticio perforándola hasta pulverizarla, para que pueda teñirse junto con las propiedades de la arcilla tiñe de negro-café las vasijas y curtido de la piel del ganado, Los taninos al fermentarse pueden extraerse ácido gálico y glucosa. Además, las vasijas dan la característica especial de la arcilla negra, lo que les da un aspecto colonial y hermoso a las vasijas. Al observar las vasijas el tono café es del tanino de la semilla y el negro proviene del hongo más hierro que contiene la arcilla le da el tono negro intenso. En general, las especies del género *Aspergillus* se encuentran como saprófitos depositados en material orgánico como plantas, semillas o suelo. Su temperatura es adaptativa, desde un mínimo de 5 °C hasta 60 °C en otras especies, aunque raras soportan temperaturas de más de 100 a 300 °C. Actualmente el *Aspergillus* es un género amorfo, que comprende entre 260 y 837 especies ^(32,33) Tal es la diversidad de especies que con el uso de tecnologías modernas como la PCR. La secuenciación ha permitido facilitar su estudio en algunos casos, siempre y cuando se disponga de una base de datos secuencial adecuada y se tenga los primers según especies a mezclar los pares de bases. La pigmentación de los hongos se debe a la síntesis de varios tipos de pigmentos y moléculas cromóforos como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas entre otros. ⁽³⁴⁾ Los pigmentos de melaninas tienen una función principal en la protección de las esporas de los hongos contra los aumentos de temperatura, la radiación y la desecación. ⁽³⁵⁾ Las melaninas están presentes en la mayoría de los hongos, encontrándose en casi todos los hongos patógenos ⁽³⁶⁾ El hábitat natural de las



especies de *Aspergillus* es el heno, semillas y el compost, utilizado como alimento para ganados vacunos. En el caso del *Aspergillus niger*. Las melaninas están compuestas de estructuras alifáticas y aromáticas de tipo indol o fenol y son sintetizadas por una amplia gama de organismos. Estos pigmentos, que son metabolitos secundarios, pueden tener diferente coloración y también pueden ser heterogéneos en cuanto a su organización estructural, composición y función. Sin embargo, todos estos pigmentos tienen propiedades sicoquímicas similares, que incluyen resistencia a la hidrólisis ácida, estructura amorfa y polidispersa, naturaleza polimérica, carga neta negativa y una estructura radicalaria estable⁽³⁷⁾. Todas las melaninas, excepto la piomelanina, son insolubles en agua y disolventes orgánicos, siendo solo solubilizadas en solventes alcalinos. Estas propiedades químicas explican los roles multifuncionales de los pigmentos oscuros que les permiten a los hongos negros adaptarse a diversas condiciones ambientales.^(27,35)

Conclusiones

Se encontraron 14 enzimas y metabolitos secundarios en la producción de pigmentos negros producidos por el hongo por stress oxidativo. Entre ellos: NADPH-ferrilhemoprotein reductase, NADPH-quinone oxidoreductase subunit A, NADPH-quinone oxidoreductase subunit B, NADPH-quinone oxidoreductase subunit C, NADPH-quinone oxidoreductase subunit D, NADPH-quinone oxidoreductase subunit F, NADH-quinone oxidoreductase subunit G, NADH-quinone oxidoreductase subunit H, NADH-quinone oxidoreductase subunit I, Urate oxidase, dihydrolipoamide dehydrogenase, FMN-dependent, NADH-azoreductase, COGO431 Nadp dependent fmn reductase, COGO655, Nad dependent fmn reductase, NADP oxidoreductase, coenzyme f420-dependent. La producen cuando hay stress oxidativo.

Abreviaturas

| | |
|----------|--|
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| UES | University of El Salvador |
| CENSALUD | Center for Health Research |
| FASTA | Format for Nucleotide Sequences |
| MACROGEN | Macroscopic Phenotype of Gene |
| MALDITOF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight |
| MERK | Merck Sharp and Dohme |
| NGS | Sanger's Sequencing Techniques |
| ORF | Open Reading Frame |
| PCR | The polymerase Chain Reaction |
| SMRT | Single Molecule, Real-time |
| SMSR | Shotgun Metagenome Sequencing Report |
| SBS | Sequencing by Synthesis |
| TGS | Third Generation Sequencing |

Gratitud y reconocimiento

A autoridades de la Universidad de El Salvador y de la Facultad de Medicina de la UES por su apoyo moral, al Maestro William Merino de biología molecular como pares evaluadores. Equipos B1 MACROGEN, Inc. Empresa Pública de Biotecnología. Corea del Sur.

Contribuciones de los autores

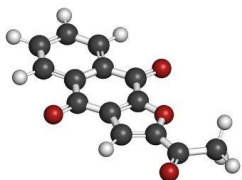
Antonio Vásquez Hidalgo es el único autor. El autor leyó y aprobó el manuscrito final.

Conflictos de intereses

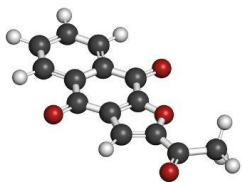
El autor declara no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Bustillo A. Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y



- otros organismos. 2010. doi: 10.13140/RG.2.1.3594.5128.
2. Casas R. *Micología general*. 2nd Caracas: universidad central de Venezuela. Edic Biblioteca;2010
3. Macrogen, Inc. /Shaun Seonwoo Lee. /Public Biotechnology Company. South Korea [Internet]. 2024 [citado 3 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://dna.macrogen.com/>.
4. Palomares J. *Revista Iberoamericana de Micología* - ISBN: 978-84-611-8776-8. *Rev Iberoam Micol.* 2007; [No proporciona datos de volumen/páginas].
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
6. Sarma SS, Latchoumycandane C, Varma A. Melanin Production in *Aspergillus*: A Mechanism for Environmental Survival and Virulence. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(4):571–80.
7. Bissett JM. Pigments and secondary metabolites of filamentous fungi: Fungal biotechnology for pigment production. *Int J Food Sci Technol.* 2015;50(1):35–45. doi: 10.1111/ijfs.12689.
8. Keller NP, Hohn TM. Metabolic Pathways and Regulation of Fungal Secondary Metabolites. *Annu Rev Phytopathol.* 1997;35(1):351–73.
9. Carroll JA, Lattanzio V, Coccetti P, Gualandi A. Regulation of Pigment Biosynthesis in Fungi: Insights into Transcriptional Control. *Fungal Biol Rev.* 2011;25(2):97–104.
10. Kwon NJ, Park JK. Transcriptional Regulation of Secondary Metabolite Biosynthesis in *Aspergillus* Fungi. *Mol Microbiol.* 2009;73(5):905–20.
11. Bogre, L, Hirt, et al. NADH and NADPH in fungal secondary metabolism: role or redox states pigment production. *Fungal Biol Rev* 2003;17(4):140-51
12. Brown SH, Dodd DA. Impact of Nutrient Depletion on Secondary Metabolism in Fungal Systems. *Fungal Ecol.* 2014;10(3):163–70.
13. Dumas M, Lemaire A, Dubois P. Substrate regulation of secondary metabolite production in *Aspergillus* species. *Mycol Res.* 2012;116(6):595–601.
14. Saito T, Hoshino T, Yamashita T. Analysis of Pigment Biosynthesis Genes in *Aspergillus* Species Using DNA Sequencing. *Mycologia.* 2008;100(6):837–44.
15. Nagai Y, Ohta T, Kawano N. Role of Environmental Factors in Regulating Gene Expression and Secondary Metabolism in *Aspergillus* species. *Fungal Genet Biol.* 2018;118:74–81.
16. Xu F, Li Y. Laccase-Mediated Biodegradation of Lignin and Its Application in Pigment Synthesis in Fungi. *J Agric Food Chem.* 2010;58(9):5485–91.
17. Mehta SK, Gupta SK, Kaul S. Understanding the Genetics of Pigment Production in *Aspergillus*: Insights from DNA-seq Studies. *Microb Biotechnol.* 2012;5(4):453–63.
18. Hancock SM, Wood LB. Dehydrogenases in Fungal Metabolism: Key Enzymes in the Production of Secondary Metabolites. *Fungal Genet Biol.* 2007;44(4):292–301.
19. Zhao W, Zhang Y, Zhang J. Dehydrogenase Pathways in Fungal Secondary Metabolism: The Link to NADH and NADPH Production. *Microb Biotechnol.* 2015;8(2):221–30.
20. Gehring AM, Munkvold GP. Fungal secondary metabolites and their role in fungal pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* 2006;43(9):655–60. doi: 10.1016/j.fgb.2006.05.004.
21. Sazanov LA, Hinchliffe P. Structure and mechanism of the mitochondrial NADH:quinone



oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2006;1757(12):1761–9. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.10.001.

22. Casas R. *Micología General*. 2nd ed. Caracas: Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca; 2010.

22. Mikolasch A, Bidochka MJ. Fungal pigments and their role in biological processes. *Mycol Res.* 2008;112(10):1147–56. doi: 10.1016/j.mycres.2008.05.001.

23. Kruppa MD, Bown LA. Fungal pigments and their industrial applications: A review. *Int J Biotechnol.* 2018;15(2):75–90. doi: 10.1007/s20093-018-0023-x.

24. Rodrigues AM, Vilela R. Fungal melanins and their role in virulence: Insights from *Aspergillus* spp. *Fungal Biol.* 2015;119(5):442–56. doi: 10.1016/j.funbio.2015.03.003.

25. Ishii T, Imai T, Takaki T. Structure and Function of NADH-Quinone Oxidoreductase Complexes: The Role of NADH Dehydrogenase in Cellular Respiration. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2007;1767(5):464–73.

26. Pradeep G, Babu G, Satyanarayana T. The Protective Role of DHN-Melanin in Fungal Survival and Virulence. *Fungal Pathog.* 2014;5(1):56–67.

27. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to fungal pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2003;29(4):241–52. doi: 10.1080/10408410390253660.

28. Hirst PJ, King JT, Sazanov AJ. Structure and mechanism of the mitochondrial NADH:quinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2011;1807(6):820–32. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.11.007.

29. Brakhage AA, Scherlach JC. Fungal secondary metabolites in *Aspergillus* and their applications in biotechnology. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):16490–510. doi: 10.3390/ijms140916490.

30. Vermelho AB, Santos AL. Biosynthesis of secondary metabolites in fungi: Implications for industrial applications. In: Sharma VK, Chisti Y, Kumar BD, editors. *Biotechnology of Fungal Metabolites*. New York: Springer; 2010. p. 287–320. doi: 10.1007/978-1-4419-7464-7_11.

31. Cruz R. Micheli y el género *Aspergillus*. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2023 [citado 3 de octubre de 2025];40(2):169–71. Disponible en: [No se proporciona URL].

32. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2007;59:1–10.

33. Hawksworth DL. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Med Mycol.* 2011;49(Suppl 1):S70–6. doi: 10.3109/13693786.2010.515234.

34. Gmoser JA, Rabe S, Gündüz N, Sulyok M, Krska R. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol Biotechnol.* 2017;4(1):15. doi: 10.1186/s40694-017-0043-4.

35. Nitiu D. Pigmentos sintetizados por hongos negros y su impacto en el deterioro del patrimonio documental en papel. *Bol Soc Argent Bot.* 2022;57(1):169–84.

36. Vega G. La pared celular de hongos patógenos: su importancia en la supervivencia del hongo y el establecimiento de las infecciones fúngicas. *Rev Soc Venez Microbiol.* 2021;41(1):1–11.

37. Lee J. Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3884. doi: 10.1128/jcm.42.8.3884-3884.2004.