UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización química de *Aspergillus nidulans* mutado en un gen que regula su metabolismo secundario

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

M.C. Olivia Márquez Fernández

Mexico, DF **Julio de 2008**

México DF, a 16 de julio del 2008

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Caracterización química de *Aspergillus nidulans* mutado en un gen que regula su metabolismo secundario

Que presentó**:**

M.C. Olivia Márquez Fernández

Comité Tutoral:

Director: Dr**. Gustavo Viniegra-González**

Co-director: **Dr. Ángel Trigos Landa**

Asesor: **Dr. Jesús Aguirre Linares**

Jurado:

Presidente: **Dr. Ernesto Favela Torres**

Secretario: **Dr. Francisco José Fernández Perrino**

Vocal**: Dr. Jesús Aguirre Linares**

Vocal**: Dr. Guillermo Ávila Acevedo**

El Doctorado en Biotecnología de la **Universidad Autónoma Metropolitana** esta incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo No. de Registro 0471-O.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del **Dr. Gustavo Viniegra-González** y del **Dr. Ángel Trigos Landa**, en el laboratorio W-104 del Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa y en el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX) de la Universidad Veracruzana, y con la asesoría académica del **Dr. Jesús Aguirre Linares**.

Olivia Márquez recibió apoyo económico de CONACYT No. de Registro: **96341** y de SAGARPA-CONACYT (**2002-C01-1713**). Agradezco al **Dr. Jesús Aguirre Linares** y a la **Bióloga Alma Olivia Sánchez González** del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México por el asesoramiento, el apoyo técnico y la amistad brindados durante el desarrollo de este trabajo, asimismo agradezco al **Dr. Atilano Gutiérrez Carrillo** de la UAM-Iztapalapa, por los experimentos de RMN.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

ACP, Proteína acarreadora de grupos acilo

CC, Cromatografía en columna

CCD, Cromatografía en capa delgada (o capa fina)

cfwA, cross feedable white (alelo A), genotipo de una cepa mutada de A. nidulans, que presenta el fenómeno de alimentación cruzada, este gen codifica para una PPT-asa.

CLS12, CLS2, Cepas mutadas de Aspergillus nidulans, su fenotipo se describe en la parte experimental

COSY, Correlation Spectroscopy

DEPT, Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
FAS, Sintasa de ácidos grasos

HMBC, Heteronuclear Multiple-Bond Correlation

HMQC, Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

HSQC, Heteronuclear Single Quantum Correlation

MM, medio mínimo para *Aspergillus* (según Pontecorvo)

NOR, Ácido norsolorínico

npgA, null pigmentation alelo A, cepa albina de A. nidulans que también presenta el fenómeno de alimentación cruzada, y cuyo gen también codifica para una PPT-asa.

NRPS, Sintetasa de péptidos no ribosomales

PCP, Proteína acarreadora de grupos peptidilo

PF, Punto de fusión

PKS, Sintasa de policétidos

PPTasa, Enzima fosfopanteteneil-transferasa

PUF, Espuma de poliuretano

ppm, Partes por millón

RMN, Resonancia magnética nuclear

Rf, Factor de corrimiento en cromatografía en capa delgada

ST, Esterigmatocistina

WT Wild type, cepa silvestre

RESUMEN

Los hongos filamentosos son capaces de producir una gran variedad de estructuras químicas, consideradas como metabolitos secundarios, que son formados por la condensación y polimerización de unidades simples como el acetato y el malonato, los cuales, son aportados por el metabolismo primario. Los metabolitos secundarios, aparentemente, no son esenciales para la sobrevivencia del organismo que los produce. Sin embargo, existen evidencias que indican la participación de estos compuestos en los procesos de crecimiento, diferenciación y reproducción. Los policétidos, constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios que incluyen diversos antibióticos, micotoxinas y factores de virulencia en hongos patógenos. Los policétidos son sintetizados por complejos proteínicos que poseen dominios con varias actividades enzimáticas, denominados sintasas de policétidos (PKS), los cuales son análogos a las sintasas de ácidos grasos (FAS). Asi mismo, las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), que de igual manera poseen varios dominios, están involucradas en la generación de diversos antibióticos y sideróforos. Tanto las PKS como las NRPS, necesitan ser activadas por la accion de 4'-fosfopanteteinil transferasas (4'-PPTasas) específicas. En *Aspergillus nidulans* existe una 4-PPTasa que aparentemente regula tanto actividades esenciales como no esenciales, ya que las mutantes con el alelo condicional *cfwA2* son incapaces de sintetizar lisina, esterigmatocistina (precursor de las aflatoxinas), lisina y los pigmentos de las esporas, cuando se incuban a temperaturas restrictivas. En este trabajo aislamos e identificamos shamixantona, emericelina, ergosterol, peróxido de ergosterol, dehidroaustinol y cerevisterol, a partir de cultivos de *A. nidulans* crecidos en fermentación sólida. Se probó la posible función de estos compuestos en la inducción de la esporulación asexual en mutantes *ΔfluG* y *cfwA2* las cuales están afectadas en la formación de conidias asexuales, encontrándose que ninguno de estos compuestos fue capaz de revertir los defectos en la esporulación. Además, demostramos que excepto en el caso del ergosterol y el cerevisterol, la síntesis de los demás compuestos aislados, dependen de la actividad de la 4'-PPTasa CfwA2/NpgA. Estos resultados indican que CfwA/NpgA y sus ortólogos juegan un papel regulador central en el metabolismo secundario de A. *nidulans* y muy posiblemente de otros hongos filamentosos.

ABSTRACT

Filamentous fungi produce and secrete a large diversity of chemical structures, formed by condensation and polymerization of simple units of acetate and malonate, which are originated of primary metabolism. Secondary metabolites have been defined as metabolic products that are no essential for growth and lack an apparent function for the producing organism. Among these, polyketides are a broad group of compounds that comprise antibiotics, mycotoxins and pathogen virulence factors. Polyketides are synthetized by the polyketides synthases (PKS) which are specialized multi-domain enzymes analogous to the fatty acid synthases (FAS). A different group of enzymes, the non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), are involved in the biosynthesis of small peptides. Both type of enzymes need to be activated by specific 4'-phosphopantetheinyl transferases (4'-PPTases). In *Aspergillus nidulans*, CfwA is a unique 4'-PPTase involved in regulation of essential and no essential functions. At the restrictive temperature, mutants carrying the conditional allele *cfwA2* are incapable to produce the mycotoxin sterigmatocystin (an aflatoxin precursor) and the conidial pigments. In this work we have purified and identified the compounds, shamixanthone, emericeline, ergosterol, ergosterol peroxide, dehydroaustinol and cerevisterol from *A. nidulans* developmental cultures grown on solid fermentation conditions. We tested these compounds in *cfwA2* and *ΔfluG* "fluffy" mutants, and found that none of them was able to remedy their developmental defects in solid medium. In addition, we have shown that except for ergosterol and cerevisterol, the biosynthesis of all other compounds, depends on the activity of the 4'-PPTase CfwA. These results support CfwA role as a central regulator of secondary metabolism in filamentous fungi.

1. INTRODUCCIÓN

Muchos compuestos económicamente importantes como las enzimas utilizadas en la producción de alimentos, los fármacos, los plaguicidas, y algunos precursores terapéuticos, son producidos por hongos filamentosos; asimismo, éstos son capaces de sintetizar toxinas altamente cancerígenas, por lo que, los efectos nocivos y benéficos de los hongos están mediados por compuestos generados a través del metabolismo secundario o especial, el cual, aparentemente no tiene una función primordial para el organismo. A pesar de su gran diversidad química, muchos metabolitos secundarios pueden ser clasificados según sus precursores y vías generales de síntesis ya que utilizan bloques sencillos de construcción como las unidades de acetato. En hongos y bacterias las principales vías de síntesis de los compuestos de tipo secundario están dirigidas por complejos proteínicos con varios dominios enzimáticos. En hongos operan principalmente las sintasas de policétidos (PKS), las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS) y las sintasas de ácidos grasos (FAS), mediante las que se producen compuestos de importancia económica como antibióticos y micotoxinas. En este sentido, *Aspergillus nidulans* ha sido organismo modelo para el estudio de procesos moleculares en la diferenciación celular, además de que produce diversos compuestos de tipo secundario que se cree están involucrados en diversas actividades de diferenciación. En esta especie se producen mediante las PKS, esterigmatocistina (ST), precursor en la síntesis de aflatoxinas y otros policétidos: como los intermediarios de los pigmentos conidiales; penicilina y sideróforos que son producto de las NRPS; a este respecto, en *A. nidulans* se caracterizó el gen *cfwA2*, cuya mutación afecta simultáneamente la síntesis de pigmentos, micotoxinas y antibióticos. *cfwA* codifica para una enzima 4'-fosfopanteteinil transferasa indispensable para activar distintos complejos enzimáticos PKS, NRPS y FAS. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el papel que juega *cfwA* en el metabolismo secundario de *A. nidulans*, para lo cual se obtuvieron y caracterizaron los principales componentes de la actividad metabólica secundaria de una cepa *cfwA2,* y se compararon con una cepa "silvestre" modificada unicamente en los genes que afectan la producción del pigmento conidial (*wA*), y la esterigmatocistina (Δ*stcE*), ambas cultivadas en soporte sólido de poliuretano.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 METABOLISMO DE HONGOS

Los hongos filamentosos comprenden un grupo heterogéneo de organismos eucariontes que ocupan diversos hábitats. Son organismos no fotosintéticos, que pueden ser saprobios, simbióticos o parásitos. Uno de los factores que les confieren este éxito adaptativo es su diversidad bioquímica y metabólica, lo que les permite la explotación de ambientes inhóspitos para otros organismos.

2.1.1 Metabolismo Primario

El metabolismo primario involucra una serie de reacciones químicas necesarias para la obtención de energía y para los procesos anabólicos de formación de células, reproducción y otras funciones fisiológicas vitales a partir de las moléculas obtenidas del medio.

La mayoría de los hongos pueden utilizar un amplio rango de carbohidratos, ácidos grasos, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuente de carbono, para el crecimiento y la obtención de energía. La primera opción son los carbohidratos monoméricos, los ácidos orgánicos simples pueden ser utilizados sin la secreción de enzimas hidrolíticas. En términos de catabolismo los hongos tienen ciclos similares a los demás eucariontes tales como la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos los cuales, además de ser compuestos de excreción tienen funciones en la optimización de energía. Los productos del catabolismo son utilizados como unidades iniciales en la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios.

Dado que una gran parte de hongos son saprobios (crecen sobre residuos orgánicos), éstos pueden utilizar un amplio rango de compuestos nitrogenados, de igual manera las moléculas más sencillas tienden a ser las primeras en utilizarse, aunque, el amoniaco y el nitrato pueden ser utilizados por la mayoría de los hongos, las proteínas y los aminoácidos también son fuente de nitrógeno y de carbono, los cuales son utilizados por una acción desaminativa para liberar amoniaco. Por otro lado, la síntesis de aminoácidos involucra la fijación de amoniaco, con la formación de glutamato y glutamina y una

posterior transaminación. Los aminoácidos también son muy importantes en la síntesis de metabolitos secundarios.

2.1.2 Metabolismo Secundario

La capacidad, por parte de algunas especies del reino Fungi, de sintetizar numerosos esqueletos hidrocarbonados, se basa en la condensación o polimerización de unidades simples como el acetato, el malonato y aminoácidos sencillos, de manera similar a las plantas. Las razones de esta producción no han sido establecidas en muchos de los casos, pero pueden ser resultado de un metabolismo no balanceado, el cual ocurre usualmente después de que la fase de crecimiento se ha detenido. Algunos autores plantean que se genera una adaptación del hongo para la utilización de sustratos variados en respuesta a la limitación de nutrientes y a la generación de estrategias evolutivas (Demain y Fang, 1999).

2.1.3 Rutas metabólicas secundarias

El metabolismo secundario de plantas, hongos y bacterias puede clasificarse según su ruta biosintética y por tanto del tipo de compuestos que generan. Existen principalmente tres rutas que pueden en ciertos casos interrelacionarse dependiendo de las especies: acetogeninas o policétidos, isoprenoides y derivados del ácido shikímico. Además, en hongos y bacterias se encuentra una ruta de producción de péptidos no ribosomales, que producen en algunos casos sustancias con capacidad de antibiósis. En todas las rutas, las fuentes energéticas y los bloques de construcción son moléculas pequeñas provenientes del metabolismo primario.

a) Policétidos

Los policétidos son una clase de productos naturales que se definen como la unión iterativa de grupos ceto- $(\text{-CO-CH}_2\text{-})_n$. Se ha propuesto que los esqueletos hidrocarbonados de los policétidos se forman a partir de la condensación tipo Claisen y descarboxilación sucesiva del tioéster de compuestos carbonílicos, como la acetil coenzima-A (CH_3CO-S-CoA) y la malonil coenzima-A (figura 1), produciendo cadenas de poliacetatos, polipropionatos y polibutiratos. Los ataques nucleofílicos de carbonos en

posición alfa al grupo carbonilo, sobre otros carbonilos y posteriores deshidrataciones, producen la formación de ciclos del esqueleto hidrocarbonado haciéndolo susceptible a posteriores modificaciones (Bu Lock, 1979).

Desde tiempos antiguos los policétidos son conocidos indirectamente por su actividad biológica. Los principios purgantes de la cáscara sagrada, el ruibarbo y las hojas de sen son antraquinonas derivadas de la ruta de los policétidos; los antiespasmódicos contienen cantidades significativas de khelina (5,8-dimetoxi-2-metil-6,7-furanocromona); asimismo, muchos de los antibióticos actualmente utilizados provienen de estas vías.

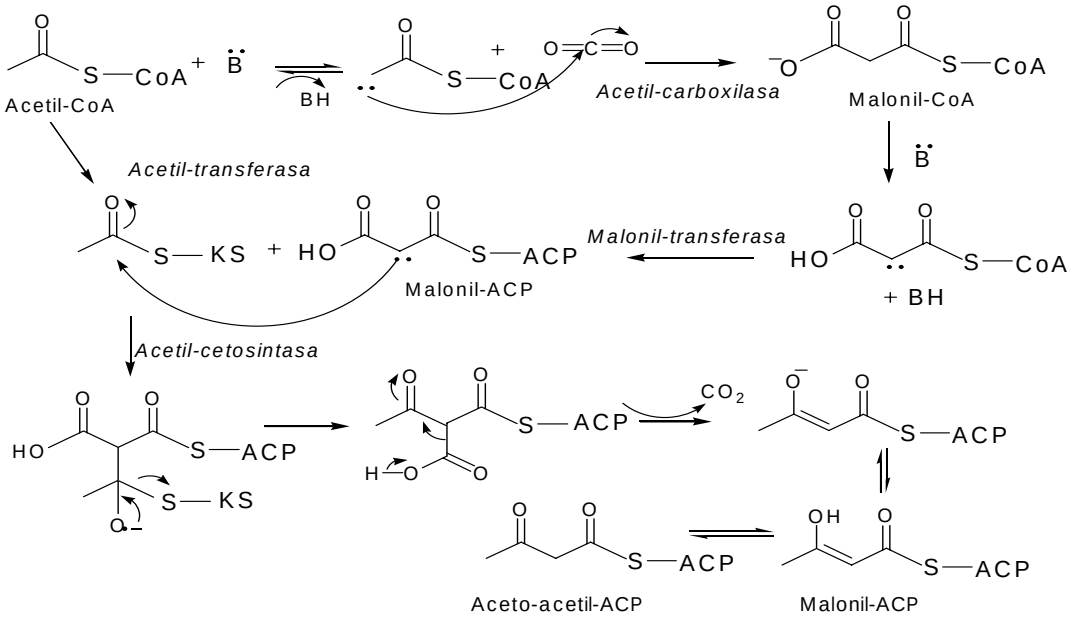


Figura 1. Esquema de las reacciones iniciales en la síntesis de policétidos, KS =cetosintasa, ACP=proteína acarreadora de grupos acilo.

b) Isoprenoides (Derivados del Ácido Mevalónico)

Son compuestos derivados de la unión tipo cabeza-cola de grupos isopreno (2-metil-butadieno). La unión de dos moléculas de isopreno forma los monoterpenos, frecuentes en los aceites esenciales; de tres los sesquiterpenos, y de cuatro los diterpenos. La biosíntesis se origina con la conversión del isopreno en pirofosfato de isopentenilo o su isómero, que al reaccionar entre sí, forman el pirofosfato de geranilo con el esqueleto base de un monoterpeno. La unión de éste con otro pirofosfato de isopentenilo, forma el pirofosfato de farnesilo farnesilo (sesquiterpeno). La unión similar del pirofosfato de

farnesilo con otro pirofosfato de isopentenilo, origina un diterpeno. Las moléculas anteriores se pueden ciclar y oxidar originando muy diversos tipos de compuestos policíclicos como los triterpenoides tetracíclicos y pentacíclicos y por eliminación de metilos, el importante grupo de los esteroides (figuras 2 y 3).

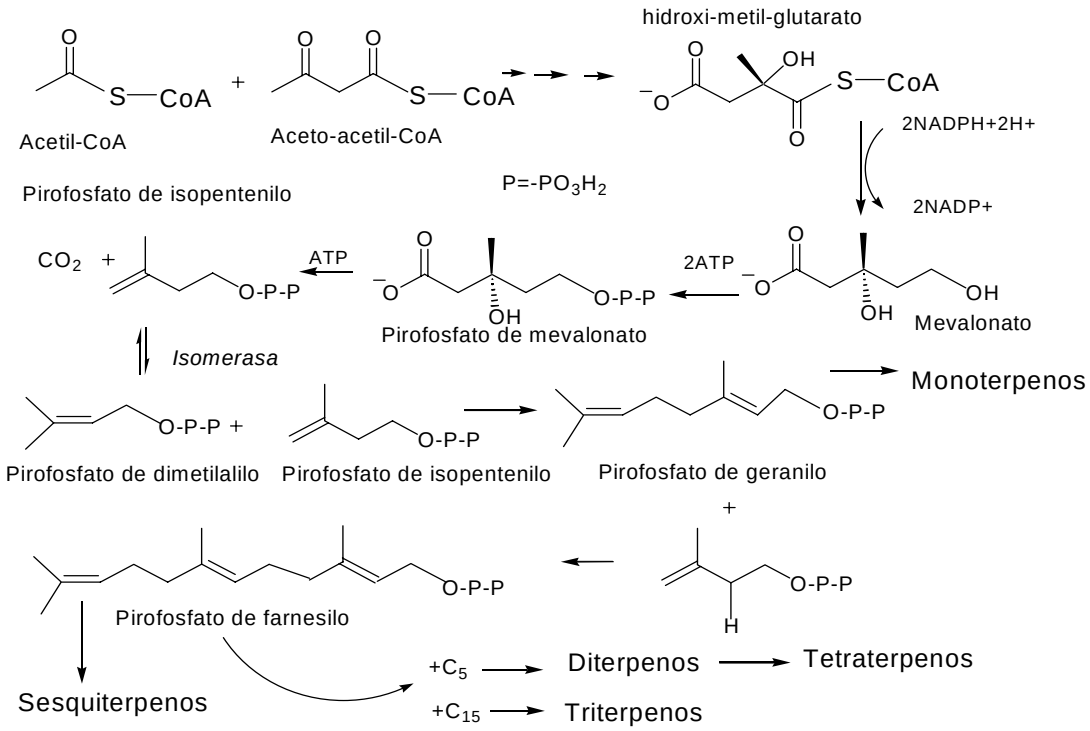


Figura 2. Biogénesis de isoprenoides

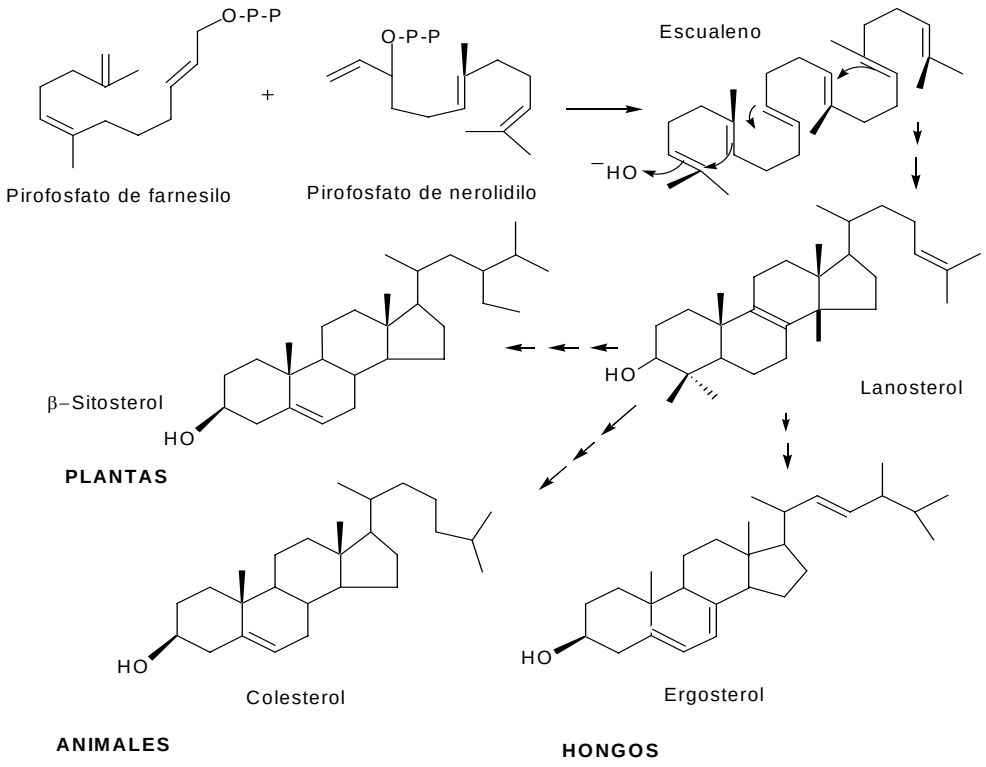


Figura 3. Biogénesis de esteroles

c) Derivados del Ácido Shikímico

En el metabolismo de los carbohidratos se produce el 4-fosfato de eritrosa y el piruvato. Estos compuestos reaccionan y originan el deshidroquinato; el cual, por deshidratación y reducción, se convierte en el ácido shikímico, intermediario de numerosos compuestos aromáticos. Este, a su vez, origina el ácido cinámico (C_6-C_3); del cual, se derivan varios grupos de metabolitos secundarios (figura 4). Esta vía es muy frecuente en las plantas, pero, también esta reportada en hongos. En los cuales, los carbohidratos sencillos son los precursores.

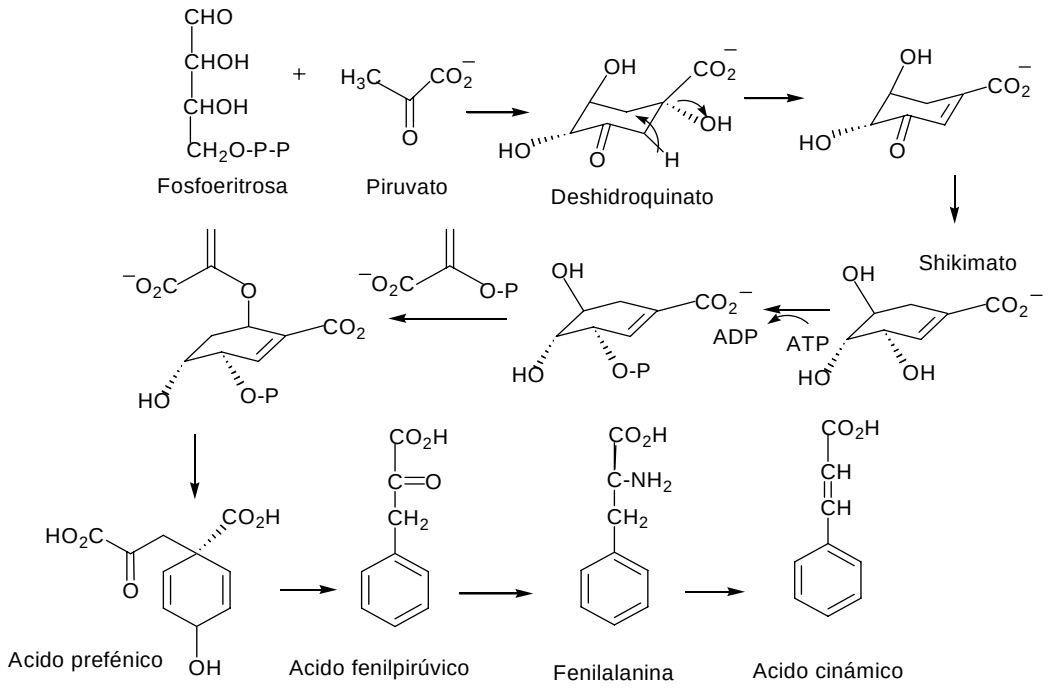


Figura 4. Biogénesis del ácido shikímico y derivados

2.2 *Aspergillus nidulans* COMO ORGANISMO DE EXPERIMENTACIÓN

A. nidulans es un hongo filamentoso que pertenece al grupo de ascomicetos cuyo hábitat natural es el suelo. Cabe mencionar que, el género *Aspergillus* es de particular importancia en las industrias alimenticia y farmacéutica, debido a la producción de enzimas, vitaminas, agentes hipocolesterémicos y antibióticos.

Asimismo, algunas especies de *Aspergillus* sintetizan micotoxinas como las aflatoxinas, que son los compuestos naturales más altamente tóxicos y carcinogénicos conocidos. La contaminación de granos como maíz, trigo, cacahuate y algodón por especies de este género, generan grandes pérdidas agrícolas en nuestro país, y en todo el mundo.

Este ascomiceto ofrece ventajas en el desarrollo de numerosas técnicas experimentales ya que es de fácil cultivo, y sus ciclos de reproducción asexual y sexual alternados están bien definidos, lo cual facilita el mapeo de sus mutantes genéticas; asimismo, existe una gran cantidad de información sobre su metabolismo y genética, y su genoma se encuentra bien caracterizado, lo que facilita la identificación de cambios genéticos asociados a los cambios de secuencia del ADN, y de ahí que, finalmente existan suficientes herramientas disponibles para realizar, estudios avanzados en biología molecular (Aguirre, 1992).

2.2.1 Policétidos en A. *nidulans*

La ruta común de la síntesis de los policétidos está relacionada evolutivamente con la síntesis de los ácidos grasos, moléculas estructuralmente distintas. Ambos tipos de sustancias son producidas por grupos proteicos, con varias subunidades enzimáticas denominados sintasas de policétidos (PKS) y sintasas de ácidos grasos (FAS) respectivamente. Se ha determinado que *A. nidulans* tiene dos tipos de FAS, una que sintetiza ácidos grasos de cadena corta, los cuales son utilizados en el metabolismo secundario, y una FAS esencial que sintetiza ácidos grasos de cadena larga, indispensables para su metabolismo primario (Brown *et al*, 1996[b]); asimismo, se ha demostrado, que este organismo tiene los tres tipos de sintasas mencionados, pero que además, en las mutantes de este hongo que no expresan PKS no se produce esterigmatocistina que es un precursor de las aflatoxinas. Pero, si producen ácidos grasos. En cambio, las mutantes FAS requieren ser suplementadas con ácidos grasos y en estas condiciones si pueden sintetizar esterigmatocistina. Este hallazgo indica que el gen PKS puede tener un control distinto del gen FAS y que por lo tanto, puede haber controles maestros diferenciados para el metabolismo primario y secundario en el género *Aspergillus*.

Diversos estudios en los agrupamientos de los genes de PKS, basados en: análisis secuenciales, complementación funcional *in vivo*, y análisis de enzimas *in vitro*, asignaron actividades específicas a los productos del gen PKS. Cada PKS consiste de un mínimo conjunto de tres subunidades proteicas: un cetosintasa-aciltransferasa (KS/AT), otra proteína que determina la longitud de la cadena hidrocarbonada (CLF) y, finalmente, una proteína acarreadora de grupos acilo (ACP), esquematizada en la figura 5. Estas proteínas son necesarias para la biosíntesis in vivo de PKS. Además, pueden presentarse cetorreductasas y varias ciclasas. (McDaniel *et al*., 1994).

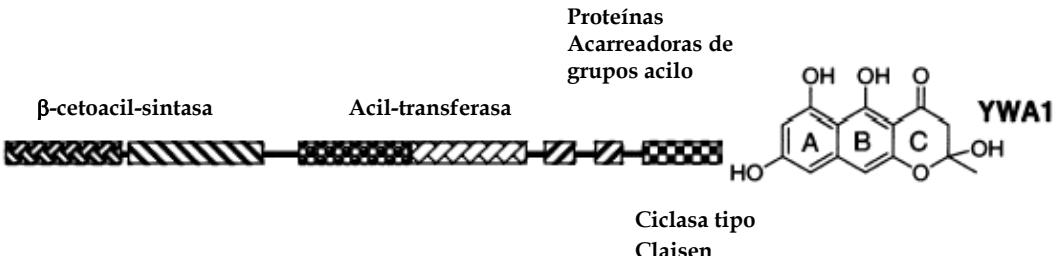


Figura 5. Ejemplo de la policétido sintasa WA, y la naftopirona YWA1, intermediario de la síntesis del pigmento de las conidias en *A. nidulans* (Watanabe y Ebizuka, Tetrahedron Letters 2002).

En 1996 se caracterizó una región de 60 kb del genoma de *A. nidulans* en el cual se encuentran la mayoría de los genes necesarios para la síntesis de ST. Esta región incluye el gen *verA* (necesaria para la conversión de versicolorina A a esterigmatocistina). Se determinó también que estas regiones se encuentran conservadas en otras especies del género *Aspergillus*. Mediante identificación de las secuencias polipeptídicas de las regiones del agrupamiento de genes, se obtuvo un alto grado de identidad con enzimas que ya habían sido citadas con anterioridad por su actividad en la síntesis de policétidos, como son una sintasa de policétidos, dos sintetasas de ácidos grasos (α y β), cinco monooxigenasas, cuatro deshidrogenasas, una esterasa, una O-metiltransferasa, una reductasa, una oxidasa y una proteína de enlace al ADN del tipo "dedo con Zn" (Brown *et al*., 1996[a]).

Por otro lado, se conoce la vía de síntesis de penicilina en *A. nidulans* (MacCabe *et al*., 1991) y se conocen algunos genes involucrados en su regulación, como *fadA,* que codifica para la subunidad alfa de una proteína G. Además, se sabe que la modificación de este gen puede regular de manera inversa la síntesis de penicilina y de ST en *A. nidulans* (Tag, *et al*., 2000). Basados en la secuencia genómica se ha estimado que *A. nidulans* contiene 27 PKSs y 14 NRPSs (Galagan, et el 2005), pero los productos y funciones de la mayoría de estas enzimas aun no se han determinado.

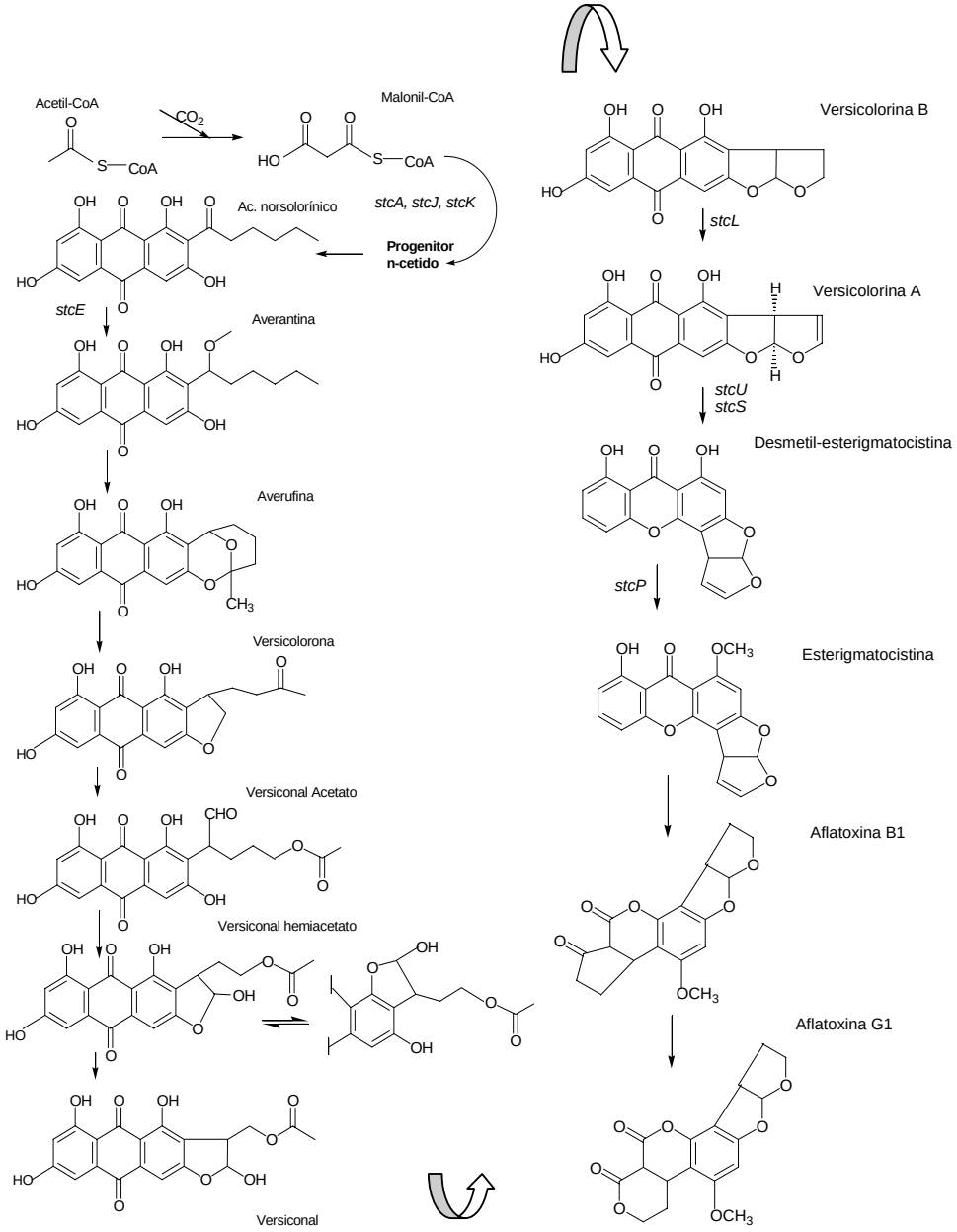
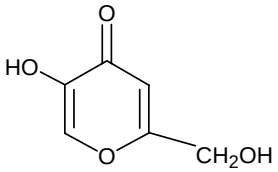


Figura 6. Ruta biogenética de esterigmatocistina y de las aflatoxinas.

2.2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Aspergillus nidulans*

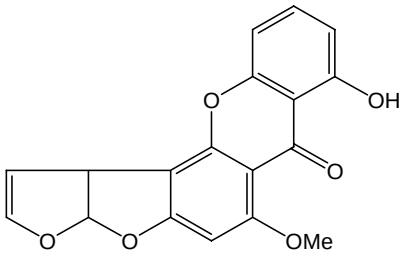
La capacidad de esta especie para sintetizar compuestos, es grande, ya que como se ha mencionado, puede generar micotoxinas, sideroforos y penicilina por acción de PKS y NRPS, pero además se han encontrado terpenoides y esteroles así como derivados del ácido shikímico. Los compuestos reportados a la fecha, en cepas silvestres, se enlistan a continuación:

Ácido kojico (a)

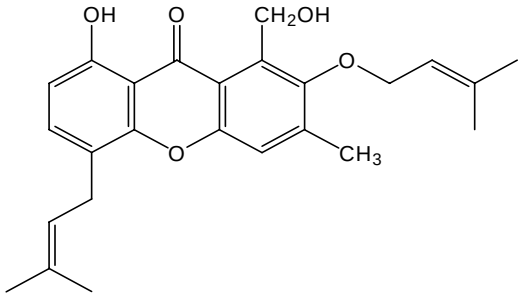


(a)

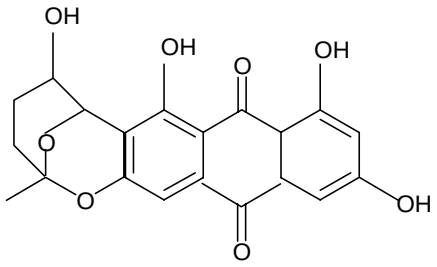
Esterigmatocistina (b), emericelina (c) y nidurufina (d) (en menor concentración), con esqueleto base de antraquinona (Turner y Aldridge; 1983).



(b)

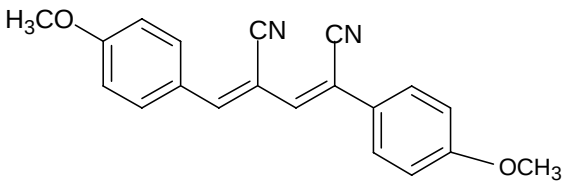


(c)

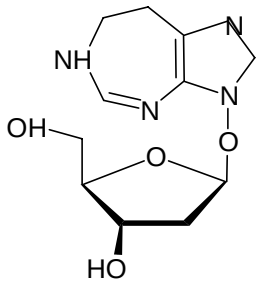


(d)

Derivados de la ruta del ácido shikímico se aislaron emerina (e) y 2-deoxi-coformicina (f) (Cole et al, 2003)

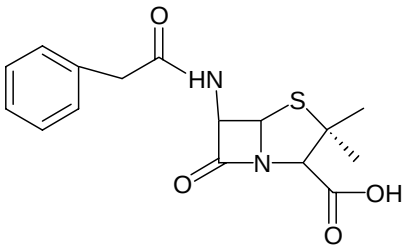


(e)

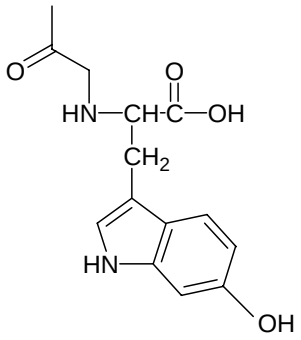


(f)

Productos de las NRPS: penicilina (g) y N-acetil-6-hidroxitriptofano (AHT) (h). La AHT es sustrato de una fenol-oxidasa específica o tirosinasa, que convierte este compuesto en el polímero melanina pigmento principal de las esporas del género *Aspergillus* (Birse y Clutterbuck, 1990):

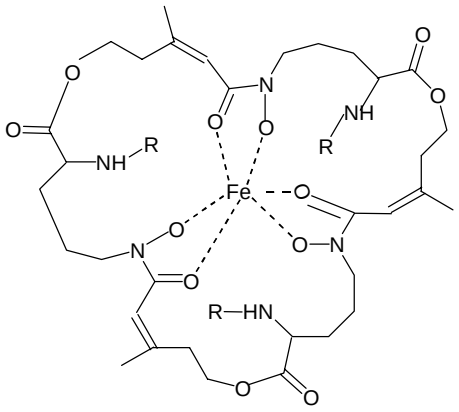


(g)

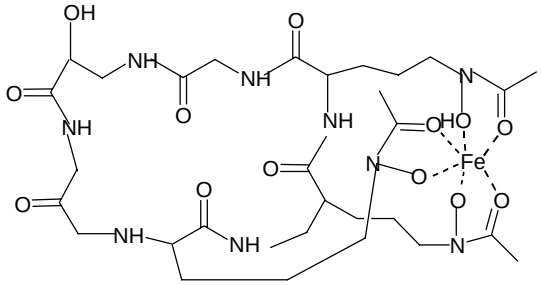


(h)

Otro tipo de compuestos aislados de *A. nidulans* producto de la actividad de las NRPS son los sideróforos, que son formados por la unión cíclica de aminoácidos, cuya función en microorganismos es la captación y el almacenamiento de hierro oxidado (Fe^{+3}), y al parecer también son un factor de virulencia. Cabe hacer notar que la triacetil-fusarinina (i) y la ferricrocina (j) se obtuvieron a partir de una cepa silvestre de esta especie (Oberegger *et al*; 2001).

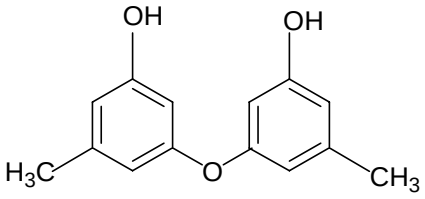


(i)



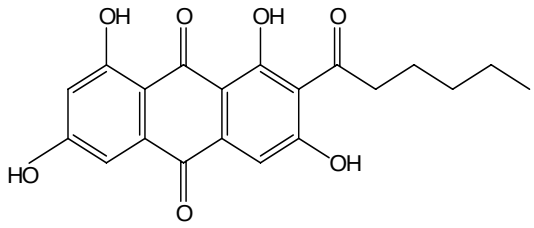
(j)

En una cepa mutante con defecto en la esporulación sexual se aisló diorcinol (k), que aparentemente es el sustrato sobre el cual actúan las enzimas p-difenol-oxidasas, responsables de la síntesis de los fenoles de farnesilo.



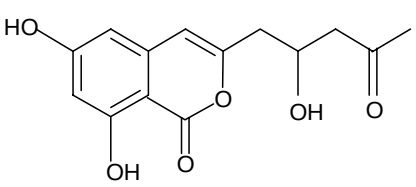
(k)

En una cepa que no sintetiza esterigmatocistina (*ΔstcE*) se obtuvo ácido norsolorínico (l), que es el primer precursor estable de la PKS-ST (Seller *et al*, 1999):

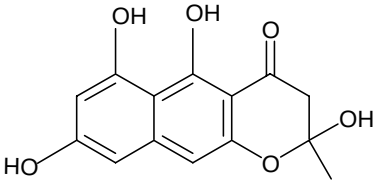


(l)

Por reconstrucción y expresión completa de la proteína WA (policétido sintasa) de *A. nidulans*, basada en la secuencia genética completa de *wa*, se aisló citreoisocoumarina (m) y una naftopirona-YWA1 (n) (Watanabe *et al*, 1999; Watanabe y Ebizuka, 2002). La naftopirona es el intermediario en la síntesis del pigmento verde de las conidias.



(m)



(n)

2.2.3 MUTANTES REGULATORIAS

En *A. nidulans* se han estudiado las señales específicas de desarrollo y diferenciación de diversos eucariontes, y para regular otros procesos, que son controlados genéticamente, los que también dependen de cambios en el ambiente. Existen diversas mutantes que han sido obtenidas por irradiación ultravioleta y que están afectadas en alguna de las etapas de formación de los conidióforos, como: *brlA* ("bristle"=cerdas), *abaA* ("abacus"), *wetA* (mojadas), *stuA* ("stunted"= achaparradas) y *medA* (medusa). La supresión del gen *brlA* impide la producción de conidióforos. Las mutantes en los demás genes desarrollan conidióforos anómalos que no tienen la misma viabilidad que la cepa silvestre (Clutterbuck, 1969; Sewall *et al*, 1990a y 1990b). Otro tipo de mutaciones son aquellas en las que se han afectado los genes necesarios para la pigmentación de las esporas, como: *wA* (esporas blancas), *yA* (amarillas), *bwA* (cafés), *pA* (pálidas), *dilA* (diluido) y *drkA, B* (oscuras). El gen *yA* codifica para una enzima *p*-difenol-oxidasa o lacasa (O'Hara y

Timberlake, 1988), que se encuentra normalmente en la pared celular de las conidias y es depositada en ellas por las fiálides. Esta enzima cataliza la reacción de un intermediario amarillo para formar el pigmento final de color verde (Clutterbuck, 1972). Las mutaciones *wA* son epistáticas a *yA*, sugiriendo que ambos genes codifican para enzimas que son secuenciales a partir de un precursor incoloro. Se demostró que *wA* codifica para una PKS, por lo que se propone que el sustrato amarillo de la lacasa es el policétido naftopirona, sintetizado por la actividad del gen *wA* (Timberlake y Clutterbuck, 1994). En *A. parasiticus* se encontró que el sustrato para la enzima producida por la actividad del gen *yA* es el policétido hidroxi-metil-naftopiranona (Brown, 1993). Por otro lado, mutaciones en genes del grupo de ST producen cepas con deficiencias en la vía de síntesis de ST y pueden acumular ciertos intermediarios de esta vía. P. ej. genes *AflR, stcF, stcA, stcU*, y *stcE*.

2.2.4 MUTANTE *cfwA2*

Por mutagénesis de la cepa TJA22 (*brlA::lacZ(argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1*) con radiación ultravioleta, se obtuvo una mutante condicional que no crece a 42 °C y que presenta defectos en la conidiación (Aguirre, comunicación personal). Las dos características son resultado de una sola mutación. A 30 °C, *cfwA2* crece igual que una cepa silvestre (wt), pero muestra un retraso muy claro en la conidiación y forma esporas asexuales (conidias) poco pigmentadas. A 37 °C, la mutante crece un poco menos que la cepa wt, muestra un retraso aún mayor en la conidiación y forma conidias totalmente albinas (Cárdenas, 1996). Además, la mutante *cfwA2* resultó incapaz de sintetizar la micotoxina ST a 30 °C (Guzmán-de-Peña, *et al* 1998). El pigmento de las conidias es un policétido producto de la PKS WA (Mayorga *et al*, 1992). Mientras que la ST es producto de la FAS StcJ/StcK y la PKS StcA (Brown *et al*, 1996a, 1996b). Los efectos pleiotrópicos en esta cepa, indican que el gen *cfwA* codifica para una proteína esencial que regula al menos dos PKS distintas (Guzmán-de-Peña *et al*, 1998). Por otro lado, se tienen reportes de la mutación *npgA1* (Han, *et al* 2005), la cual produce conidias blancas pero crece bien a 42 °C. Mediante pruebas de complementación genética en diploides y de mapeo genético fino, se demostró que *npgA1* y *cfwA2* definen al mismo gen. El gen *npgA* ya ha sido clonado recientemente (Gen Bank AF198117) por lo que el análisis de la secuencia *npgA* indica que NpgA/CfwA corresponde a una enzima 4'-fosfopanteteinil-transferasa (Reuter

et al. 1999). Este grupo de enzimas transfieren la 4'-fosfopanteteina de la coenzima A (CoA) a proteínas ACP ("acyl carrier protein") individuales, o a los dominios ACP de las FAS y PKS modulares, así como a los dominios PCP ("peptidyl carrier protein") de las NRPS, haciéndolas funcionales (Figura 7; Geiger y López-Lara, 2002; Keating y Walsh, 1999; Walsh *et al*. 1997). Debido a que CfwA es esencial para la sobrevivencia del hongo, se ha concluido, que esta enzima es indispensable para la síntesis de lisina, y para activar las FasA/B, responsable de la síntesis de ácidos grasos necesarios para *A. nidulans* (Mootz *et al*, 2002). Además, se necesita para activar a la FAS StcJ/StcK y la PKS StcA, involucradas en la síntesis de ST (Brown *et al*, 1996a, 1996b) y de la naftopirona (YWA) precursor del pigmento de las conidias (Mayorga, 1999). Más recientemente se ha encontrado que *cfwA2* también es necesario para la síntesis de derivados de ciertos aminoácidos, como la penicilina (Keszenman-Pereyra et al, 2003) y los sideróforos (Oberegger *et al*, 2003) lo que indica que las NRPS involucradas también son afectadas por esta enzima.

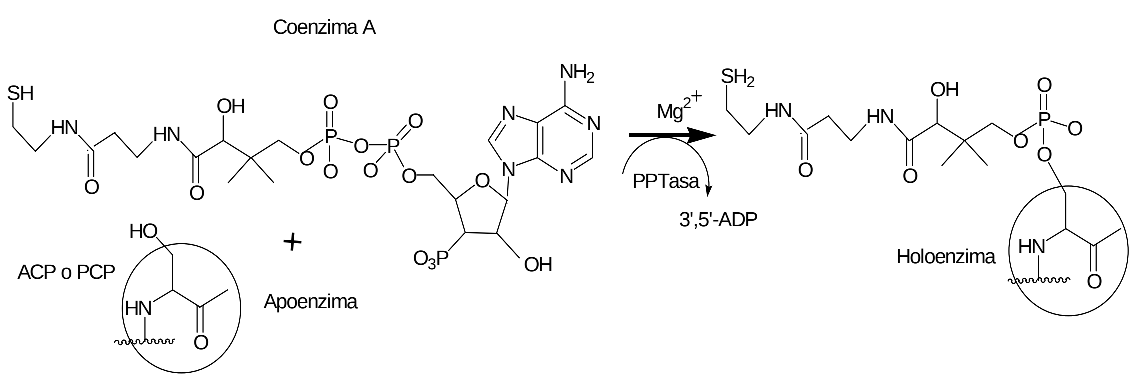


Figura 7. Reacción catalizada por las PPTasas, transferencia de el grupo fosfo-panteteinilo de la coenzima A, hacia un residuo de serina de la proteína acarreadora de grupos acilo (o peptidilo).

Es importante resaltar que CfwA/NpgA es la primera 4'-fosfopanteteinil transferasa de hongos que es capaz de activar un amplio rango de sintasas y sintetasas, FAS, PKS y NRPS de un organismo, y que por lo tanto impacta la síntesis de metabolitos secundarios sin afectar totalmente el desarrollo. Al parecer el genoma de *A. fumigatus* y *N. crassa* muestran solamente un gen homólogo de *cfwA*. Esta semejanza de la función CfwA en los hongos, así como la posibilidad de generar mutaciones condicionales como *cfwA2* o con especificidad diferencial como *npgA1*, hacen a CfwA un blanco potencial para controlar la producción de metabolitos secundarios dañinos (micotoxinas) y útiles (antibióticos).

2.2.5 RELACIÓN ENTRE DESARROLLO Y METABOLISMO SECUNDARIO EN *A. nidulans*.

El crecimiento vegetativo es un estado fisiológico estable de la célula. Esta estabilidad deriva principalmente del ajuste del metabolismo ante cambios continuos internos y externos. Muchos microorganismos pueden continuar creciendo en casi cualquier condición ambiental con un mínimo de nutrientes, sin embargo, en condiciones que limitan el crecimiento vegetativo, muchos microorganismos forman células o estructuras celulares que se encuentran relativamente aisladas del medio ambiente. A su vez, estas células especializadas se encuentran en otra fase estable. Por lo tanto, el proceso de diferenciación celular se puede considerar como una transición de varios estados equilibrados (Hansberg y Aguirre, 1990).

La formación de esporas en microorganismos es un ejemplo de esta diferenciación. En el ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* se alternan diferentes estados de diferenciación. Tanto los procesos de generación de esporas asexuales, o conidias, durante la reproducción asexual (conidiación), como la producción de esporas sexuales durante el ciclo sexual (ascoporogénesis), responden a estímulos externos e internos.

El ciclo asexual se divide en dos fases: la de crecimiento y la de reproducción, la fase de crecimiento involucra la formación de una red no diferenciada de células interconectadas, o hifas, que en conjunto forman un micelio. Bajo ciertas condiciones ambientales y nutricionales, algunas de estas células detienen su elongación y empiezan su fase reproductiva asexual, formando un conidióforo multicelular que produce múltiples cadenas de esporas uninucleadas llamadas conidios (Figura 8; Adams *et al*, 1998).

La biosíntesis de metabolitos secundarios se ha asociado a la diferenciación celular o desarrollo en los hongos. De hecho, muchos de estos compuestos son producidos por organismos que tienen un crecimiento filamentoso y una morfología más o menos compleja. También, se relacionan con los procesos de esporulación (Mapleston *et al*, 1992). Estos últimos, se pueden clasificar en tres categorías: metabolitos que activan la esporulación como algunos ácidos grasos (linoléicos); pigmentos que son requeridos como componentes de las estructuras de reproducción, como las melaninas requeridas para la formación de esporas íntegras; y metabolitos tóxicos que se secretan en la etapa de esporulación (Calvo *et al*, 2002).

La producción de compuestos del metabolismo secundario generalmente comienza en una etapa tardía del crecimiento microbiano, frecuentemente, una vez que inician la fase estacionaria (Bu'Lock, 1961). En algunas observaciones tempranas, se ha encontrado que las condiciones ambientales requeridas para la esporulación y el metabolismo secundario, son similares y más restringidas que las condiciones que favorecen el crecimiento vegetativo (Sekiguchi y Gaucher, 1977). Sin embargo, ambos procesos no están regulados por un mismo detonante del medio ambiente, ni son dependientes, ya que en cultivos sumergidos de *A. nidulans*, donde no se observa la formación de conidias, si se produce esterigmatocistina. De igual manera, existen mutantes en los genes que regulan la producción de ST, que esporulan normalmente (Shimizu y Keller, 2001). Sin embargo, se encontró que la esporulación y la producción de esterigmatocistina en *A. nidulans* están co-regulados en un sitio, activándose en el momento que se expresa el gen denominado *brlA*, el cual es esencial en el paso del crecimiento vegetativo a la reproducción asexual. (Adams *et al*, 1998; Clutterbuck, 1969; Timberlake y Clutterbuck, 1994). Más aún, se ha determinado que la iniciación de la esporulación requiere del control del crecimiento proliferativo, en respuesta a una señal extracelular que funciona específicamente activando el desarrollo asexual (Lee y Adams, 1994; Yu *et al*, 1996). La producción de la señal de inicio de la fase asexual, requiere de una proteína FluG que funciona activando un dominio regulador de la proteína G o RGS, llamada FlbA, la que su vez actúa activando o inhibiendo la señal FadA que es la subunidad alfa de una proteína G (Hicks *et al*, 1997). Cuando la señal dependiente de FadA es activada en respuesta a algún factor, estimula el crecimiento vegetativo y bloquea la esporulación. FlbA tiene la capacidad de inactivar FadA mediante su dominio proteico con actividad de GTPasa.

La caracterización de mutantes algodonosas o fluffy, demostró que la esporulación está retardada o no se presenta en las cepas *fluG* y *tmpA*, ambos genes esenciales para la conidiación (Soid-Raggi *et al*, 2006). El gen *tmpA* codifica para una flavoproteina transmembranal conservada en plantas y hongos. Y la sobre-expresión de cualquier de estas dos proteínas, induce el desarrollo de conidióforos, en condiciones que normalmente reprimen este proceso; a su vez los defectos de conidiación en las mutantes nulas de estos genes, pueden ser revertidos cuando son cultivadas junto a una cepa silvestre. Por lo que se propone, que ambos genes son requeridos para la producción de compuestos cuya función es la inducción de la esporulación.

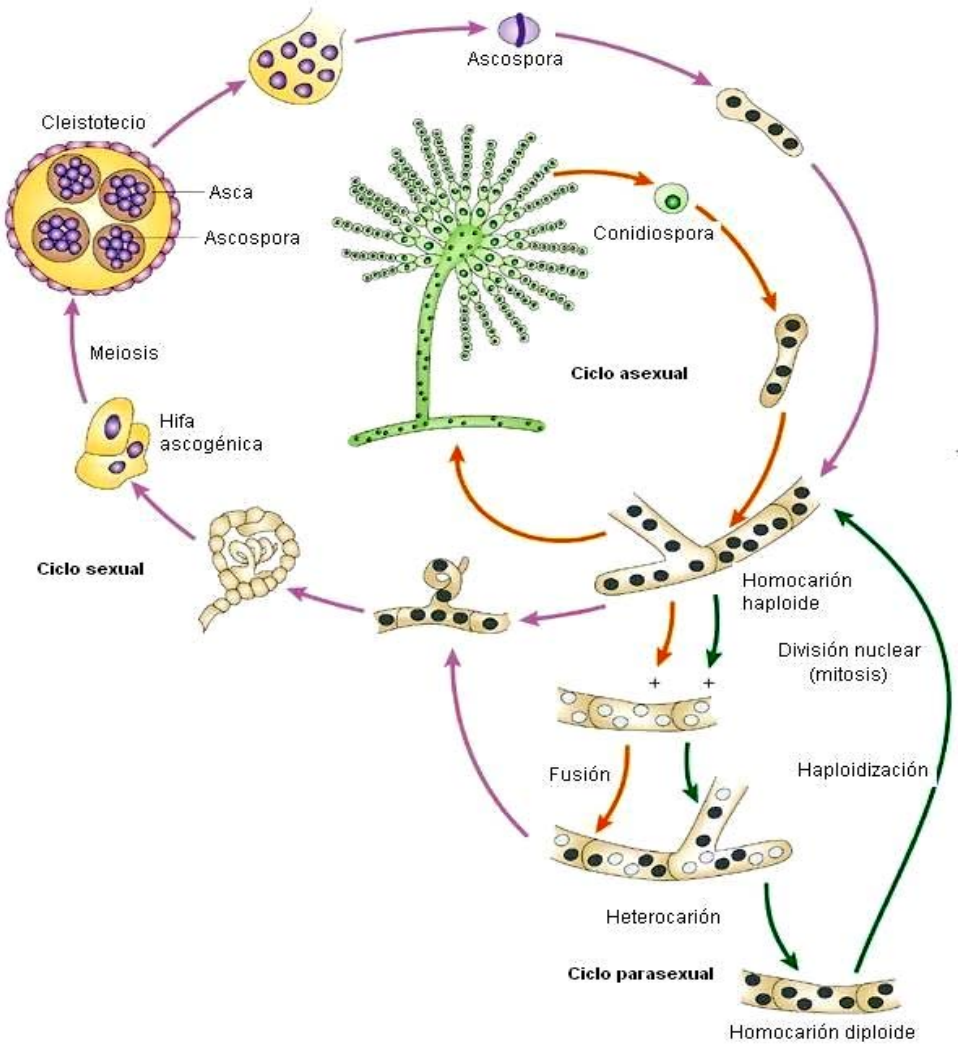


Figura 8. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* (*modificado de Nature Reviews & Genetics, 2005).*

2.3 FERMENTACIÓN SÓLIDA

Desde hace más de dos décadas, se ha utilizado el cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso, impregnado con un medio de cultivo líquido, el cual se extiende en una capa fina en contacto con la fase aérea (Viniegra-González, *et al*; 2002). Hongos, levaduras y bacterias pueden crecer en este tipo de soportes; no obstante, existe mayor cantidad de información con respecto al cultivo de hongos filamentosos. La forma de crecimiento de estos hongos, que resulta de la elongación apical en forma lineal, con la

generación de nuevas hifas por ramificación, que se extienden transversalmente de manera exponencial, resultan en una alta velocidad de crecimiento, y gran capacidad de cubrir eficientemente las superficies de cultivo (Mitchell *et al*, 1988). Aunado a este hecho, los hongos filamentosos tienen tolerancia a bajas actividades de agua (A_w< 0.85) y a una alta osmolaridad (Pandey, 1992). Lo que permite que este tipo de hongos sean la microbiota más adecuada para este tipo de fermentación. De hecho los sistemas de fermentación sólida simulan las reacciones de fermentación que ocurren en la naturaleza (Lonsane *et al*, 1992). Por otra parte, se conoce que las enzimas hidrolíticas son secretadas por el ápice de las hifas, lo que les permite penetrar en la mayoría de los sustratos sólidos naturales. Este proceso se ve mejorado en la fermentación sólida, ya que no existe dilución en el medio de estas enzimas, lo que hace que su acción sea más eficiente (Romero, 2001).

Existen ciertas características que debe cumplir un soporte sólido para que el proceso de fermentación sea óptimo, como: poseer una matriz porosa, que puede ser biodegradable o inerte, y que tenga una superficie de área grande por unidad de volumen (entre 1 x 10^3 y 1 x 10^6 cm.^{2}/cm^3), para que el micelio pueda crecer en forma de capas finas en contacto con el aire, y se facilite su oxigenación. El soporte también debe tener la capacidad de absorber agua en una proporción que sea una o varias veces su peso, para que se produzca una actividad de agua en la interfase sólido-líquido. Lógicamente, el soporte sólido, debe estar libre de contaminantes o inhibidores del crecimiento de microorganismos, debe de absorber o contener nutrientes como: carbohidratos, fuentes de nitrógeno y fósforo y sales minerales, para permitir el crecimiento de hongos. Estas condiciones son cumplidas por la mayoría de los soportes sólidos naturales como arroz, avena, bagazo de caña, pulpa de café y salvado de trigo (Raimbault, 1998).

Más recientemente, se ha introducido el uso de sustratos sólidos inertes, como la amberlita IRA 900 (Auria *et al*, 1990) y la espuma de poliuretano (Zhu *et al*, 1994). Se reconocen ciertas ventajas con el uso de este último soporte, por ejemplo, se puede medir directamente el aumento de la biomasa; y se pueden crear condiciones aeróbicas más homogéneas en el fermentador (o contenedor), permitiendo un mayor aporte de oxigeno. Además se reducen las impurezas en los productos de fermentación, ya que el soporte no es biodegradable y de esa forma se controla el aporte de nutrientes, evitándose así, los productos derivados de la posible degradación del soporte sólido (Aidoo *et al*, 1982).

A este respecto, se tiene información acerca de la obtención de rendimientos más altos de enzimas y metabolitos secundarios, en fermentación sólida, al ser comparados con los obtenidos en fermentación líquida (Barrios-Gonzáles *et al*, 1990; Zhu *et al*, 1994; Díaz-Godínez *et al*, 2001). Además, los avances en el escalamiento de la fermentación en estado sólido han permitido el control y la eficacia sobre la producción de productos como antibióticos, saborizantes, conservadores de alimentos, enzimas, pigmentos y más recientemente, fármacos.

Tabla 1. Producción de metabolitos secundarios usando la fermentación en sustrato sólido (Robinson *et al*, 2001).

PRODUCTO	MICROORGANISMO	SUSTRATO
Aflatoxinas	*Aspergillus flavus*	Arroz, maíz, etc.
Alcaloides del ergot	*Claviceps spp.*	Bagazo de caña
Acido Giberélico	*Fusarium moniliforme*	Cascarilla de trigo
Penicilina	*Penicillium spp.*	Bagazo de caña
Surfactantes	*Bacillus subtilis*	Soya
Tetraciclinas	*Aspergillus spp.*	Papa

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El entendimiento de los mecanismos que regulan el metabolismo secundario de los hongos, en especial del genero *Aspergillus*, puede ser de importancia práctica, ya que ofrece nuevos horizontes para el bloqueo de la producción de metabolitos secundarios tóxicos, como las sustancias patogénicas de algunos hongos, y las micotoxinas, que representan un serio problema en la conservación de granos y alimentos. Igualmente, ofrece la posibilidad de obtener mutantes superiores para la obtención de compuestos de interés farmacéutico, como los antibióticos, o las estatinas hipocolesteremiantes, producidas por *A. terreus*, que ya son obtenidos mediante fermentación sobre soportes sólidos.

Por ello, se justifica la caracterización química de *Aspergillus nidulans* mutado en el gen *cfwA2*, involucrado en la síntesis de policétidos y en otras vías metabólicas, y compararlo con una cepa silvestre, con el fin de confirmar el rol que juega este gen en la biosíntesis de metabolitos.

4. HIPÓTESIS

La cepa *cfwA2* es incapaz de sintetizar los derivados de policétidos y de otras vías del metabolismo secundario que dependen de la actividad de la enzima CfwA (fosfopanteteneil transferasa).

5. OBJETIVO

Determinar si la mutación *cfwA2* (cepa CLS2) afecta la biosíntesis de policétidos y otras vías metabólicas que dependen de la enzima fosfopanteteneil-transferasa *Cfwa2/NpgA*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

i. Determinar el tiempo y la concentración de medio de cultivo en el que se observa (por CCD) la producción de metabolitos secundarios en una cepa "silvestre" de *A. nidulans* , utilizando fermentación sólida en espuma de poliuretano

ii. Caracterizar los metabolitos secundarios de una mutante *cfwA2* de *Aspergillus nidulans* y compararlos con los producidos por una cepa "silvestre" (*wA3, ΔstcE*).

iii. Probar si los compuestos obtenidos de la cepa "silvestre" son capaces de inducir la esporulación en mutantes con déficit en la conidiación.

6. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron dos cepas de *A. nidulans*, una "silvestre" o CLS12, con las mutaciones *ΔstcE*, y *wA3*, que evitan la presencia de la esterigmatocistina y del pigmento verde de las conidias, respectivamente; y la otra CLS2, con el gen *cfwA2*. Las características fenotípicas de ambas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características de las cepas de *A. nidulans* utilizadas

Cepa	Genotipo	Fenotipo relevante	Fuente
CLS12	*wA3, pabaA2, veA, ΔstcE*	No produce esterigmatocistina ni pigmento de las esporas	Dr. Jesús Aguirre IFC-UNAM
CLS2	*wA3, pabaA2, veA, ΔstcE, cfwA2*	Sensible a temperatura, esporas albinas	Dr. Jesús Aguirre IFC-UNAM

Las cepas se mantuvieron conservadas en viales con agar de medio mínimo (MM) a 4 °C. Utilizando técnica aséptica y bajo una campana de flujo laminar, se propagaron por picadura en tubos de cultivo con agar inclinado, cada 2 ó 3 semanas. Cinco días previos a las fermentaciones en espuma de poliuretano, se realizaron resiembras en al menos 10 cajas Petri con 25 ml de agar de MM, para obtener cultivos confluentes de las dos cepas, estos cultivos de cinco días, se utilizaron como inóculo para preparar las suspensiones de esporas que se utilizarían en las pruebas y el cultivo para extracción.

6.1 Determinación de la concentración y el tiempo de cultivo mediante curvas de crecimiento

Para determinar una concentración que nos asegurase una mejor producción de compuestos, se utilizó únicamente la cepa silvestre (CLS12). El medio utilizado en todas las pruebas fue MM para *Aspergillus* reportado por Hill y Kafer, (1979), cuya composición es la siguiente:

MEDIO MINIMO 1X 1X (glucosa-oligoelementos)

Glucosa	10 g
Solucion de sales	50 ml
Elementos traza	1 ml
PABA 17%	0.5ml
Agua destilada cbp	1000 ml
Ajustar el pH a	6.5

Solución de sales:

$NaNO_3$	120 g
KCl	10.4 g

$MgSO_4.7H_2O$	10.4 g
KH_2PO_4	30.4 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Elementos traza:

$ZnSO_4.7H_2O$	2.2 g
H_3BO_3	1.1 g
$MnCl_2.4H_2O$	0.5 g
$FeSO_4.7H_2O$	0.5 g
$CoCl_2.5H_2O$	0.16 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.16 g
$(NH_4)6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0.11 g
Na_2EDTA	5 g
Agua destilada cpb	100 ml

De esta composición, únicamente se realizaron cuatro variaciones de concentración de la glucosa (10 g/l = 1X) y de oligoelementos (solución de sales y elementos traza =1X). En la siguiente tabla se observan las concentraciones de las diferentes soluciones utilizadas.

Tabla 3. Aporte de glucosa (X) y oligolementos (X) utilizados en cada concentración

Nutriente	1X1X	2X1X	5X1X	5X½X	5X2X
Glucosa*	10	20	50	50	50
$NaNO_3$*	6	6	6	3	12
KCl*	0.52	0.52	0.52	0.26	1.04
$MgSO_4.7H_2O$*	0.52	0.52	0.52	0.26	1.04
KH_2PO_4*	1.52	1.52	1.52	0.26	3.04
Elementos traza	< 22 ppm	< 22 ppm	<22 ppm	<11 ppm	<44 ppm
PABA (auxótrofo)	0.85 mg	0.85 mg	0.85 mg	0.42 mg	1.7 mg

*En gramos por litro de agua destilada

a) Preparación de la espuma de poliuretano (de baja densidad, 15 g/l).

Se cortó el PUF en cubos de aproximadamente 0.5 cm de lado, se lavó dos veces con agua caliente y soluciones de NaOH al 0.5 y de HCl al 0.2 % para remover las impurezas y gomas, y finalmente se enjuagó con agua fría. Se eliminó el exceso de agua y se llevó a peso constante en estufa a 60 °C. Se dispuso aproximadamente 1 g de PUF (a peso constante) por matraz Erlenmayer y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.

b) Preparación del inóculo de esporas

Bajo campana de flujo laminar, se colectaron las esporas de cultivos confluentes de cinco días, crecidos en cajas Petri, con 10 ml de Tween-80 al 0.1% estéril. La suspensión de esporas se colocó en un vortex para romper los cúmulos de estas. Se tomó una dilución

1:10 de la suspensión y se cuantificó el numero de esporas por 1 ml, con una cámara de Neubauer.

c) Preparación de los matraces de fermentación

Se tomó el volumen necesario de la suspensión de esporas para obtener una concentración final de 1 x 10^7 esporas por 1 ml de MM (en 25 ml de MM, por gramo de PUF). La suspensión de esporas se adiciona al volumen total del medio, y se mantiene en agitación con un agitador magnético estéril y una placa de agitación. Se utilizaron tres matraces por cada tiempo de muestreo.

De manera aséptica, se transfirieron 25 ml de MM (inoculado con esporas) y se depositaron en cada matraz con PUF, y se agitaron para homogeneizar la absorción por el poliuretano. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de incubación con temperatura controlada entre 32 y 34 ^oC. Asimismo, se colocaron tres matraces blanco, que fueron tratados de manera similar pero sin inóculo de esporas para tener un control de esterilidad.

Los tiempos de incubación fueron a partir de las 24 horas, y 2, 3, 5, 6, 8 y 10 días. Después de cada tiempo se filtraron por medio de vacío, con una membrana de nitrocelulosa Millipore de 0,45 µm de tamaño de poro, previamente tarada a 60°C. Se presionó el PUF y se lavó tres veces con agua destilada para eliminar los solutos que no fueron asimilados por el hongo. El PUF y la membrana se llevaron a sequedad a 60°C y se pesaron.

La cantidad de biomasa producida, se obtuvo de la diferencia entre los pesos iniciales y finales del PUF y de la membrana. Se registraron los pesos para cada concentración de nutrientes y por tiempo de muestreo.

d) Extracciones y cromatografía

Se realizaron las extracciones del medio de fermentación y de la biomasa con acetato de etilo utilizando envases se vidrio con tapón de rosca para la biomasa. El caldo de fermentación se colocó en embudos de separación con acetato de etilo, se separó el disolvente y se eliminó bajo presión reducida. Las extracciones del caldo de cultivo, se repitieron por tres veces consecutivas con acetato de etilo. Se tomaron los pesos secos de los extractos para cada tiempo y concentración de nutrientes. Los resultados se promediaron para cada tiempo y se graficaron.

Se realizaron placas de cromatografía de los extractos utilizando gel de sílice marca Merck 60 GF_{254} sobre un placas de vidrio y cromatofolios Merck de gel de sílice 60 GF_{254} de 0.2 mm de espesor, y como fase móvil mezclas de Hexano-Acetato de etilo en diferentes

proporciones. Los cromatogramas se observaron bajo luz ultravioleta de longitudes de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y vapores de yodo, para evaluar la producción de compuestos derivados de su metabolismo secundario.

6.2 Fermentaciones en espuma de poliuretano

El PUF, fue acondicionado como se describe previamente. De esta forma se pesó aproximadamente 1 g de PUF por matraz, y se dispusieron en matraces Erlenmayer de 500 ml, los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121 ^{o}C por 20 minutos. Se utilizó medio mínimo con una concentración de 50 g/l de glucosa, ya que fue la concentración en la que se obtuvo un buen rendimiento del extracto con acetato de etilo, y a su vez se observaron un mayor numero de compuestos en CCD.

En condiciones asépticas, se inoculó el medio mínimo, con 1 x 10^{7} esporas por ml, y se mantuvo en agitación en un vortex. Se distribuyeron 25 ml del medio inoculado por matraz. Para la cepa CLS12 se colocaron 410 matraces Erlenmayer de 500 ml. (10.2 litros de medio); para la cepa CLS2 se utilizaron 200 matraces (en total 5 litros). De igual manera, se colocaron matraces blanco únicamente con MM. Todos los matraces fueron incubados a 30-34 °C por 7-8 días, ya que se observó previamente, que en este tiempo no existe aumento en el número de compuestos observados en CCD. Durante la incubación, se tomaron muestras de forma aleatoria, tanto de los matraces inoculados como de los blancos de esterilidad, para su observación al microscopio, con tinción de Gram, para determinar la presencia de bacterias o de algún otro hongo contaminante.

6.3 Extracción

Al final de la incubación, se les agregó acetato de etilo como disolvente de extracción y se dejaron en maceración por 30 días. Posteriormente, se separó el poliuretano de la fase liquida, mediante filtración utilizando papel filtro Whatman No. 1. El poliuretano al cual se quedó adherida la biomasa, se dejó secar a temperatura ambiente. El caldo de fermentación, y el disolvente, se separaron por diferencia de polaridad. El acetato de etilo fue eliminado en un rotavapor. Las extracciones del medio de cultivo se repitieron tres veces más con acetato de etilo, todas las extracciones fueron reunidas en una sola muestra, y se registro su peso.

Una vez seco el poliuretano y la biomasa, se colocó en un extractor continuo, líquido-líquido, utilizando metanol como disolvente de extracción. El disolvente se eliminó en un rotavapor y los extractos se reunieron en una sola muestra.

6.4 Observación de compuestos

Mediante CCD, se realizaron observaciones preeliminares utilizando gel de sílice, Merck 60 GF_{254}, sobre placas de vidrio y cromatofolios Merck de gel de sílice 60 GF_{254} de 0.2 mm de espesor. Como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones. Los cromatogramas se observaron con luz ultravioleta de longitudes de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y fueron revelados con vapores de yodo.

6.5 Cromatografía en columna

Los extractos de las cepas CLS12 y CLS2 (15 g y 5 g respectivamente), se sometieron a separación por cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 (Merck 0.040-0.063 mm). Se eluyeron con hexano y hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad. El volumen de las fracciones eluídas fue de 25 ml de disolvente, y fueron monitoreadas por cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando cromatofolios de gel de sílice (Merck GF_{254}) y mezclas hexano-acetato de etilo como fase móvil, siendo revelados con luz ultravioleta y vapores de yodo.

6.6 Bioensayo

Los compuestos purificados de la cepa CLS12 (2, 3, 4 y 5) fueron probados en cuatro cepas algodonosas, con las mutaciones *cfwA2, npgA, ΔfluG, y fluF1*, con el fin de determinar si dichos compuestos, participan en el mecanismo de señalización de la esporulación. Para lo cual se disolvieron 4 mg de cada compuesto en 2 ml de cloroformo. Se aplicaron 2 µl de esta solución sobre discos de papel filtro Whatman No.1, previamente lavado con metanol y hexano. Como controles se utilizaron discos de papel filtro impregnados con el disolvente. Se colocaron los discos de los compuestos, más el disco control, de manera equidistante del borde de una colonia aislada (con 48 h de incubación a 37 ^{o}C). El experimento fue realizado por cuadruplicado. Las observaciones se realizaron a las 24 y 48 h de incubación, después de haber colocado los discos.

6.7 Determinación de ácidos grasos

Se pesaron 20 mg de la partición hexánica del extracto con acetato de etilo, de cada cepa, y se mezclaron con 1 ml de hidróxido de sodio 0.5 M, en un vial de vidrio; la mezcla se incubó en baño María por 15 minutos a 70 ºC. Posteriormente se agregaron 800 ml de trifluoruro de boro y se mantuvieron otros 15 minutos más a 70 ºC. Una vez a temperatura ambiente, se agitaron con 1 ml de hexano. La fase hexánica se separó y se deshidrató con sulfato de sodio. La extracción hexánica se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados fueron comparados con estándares y con una base de datos de ácidos grasos.

7. RESULTADOS

7.1 Curvas de crecimiento y condiciones de cultivo

Mediante las curvas de crecimiento, en soporte inerte espuma de poliuretano, establecimos la concentración y el tiempo en el cual se observaron por CCD, el mayor número de compuestos, utilizando únicamente la cepa CLS12 (silvestre). También se tomaron en cuenta el rendimiento del extracto con acetato de etilo y el peso de la biomasa.

Los promedios de pesos, tanto de biomasa como de extractos orgánicos (con acetato de etilo), se graficaron por tiempo y condición de nutrientes. Como se puede observar en la grafica (figura 10), el mayor rendimiento de biomasa fue obtenido de las 48 h a las 72 h de incubación, con una relación $5X^1/_2X$ de glucosa/oligoelementos. Sin embargo, en los cromatogramas en CCD, se observó un mayor número de compuestos en las extracciones del caldo de fermentación, cuando se utiliza una relación 5X1X glucosa/oligoelementos, con un tiempo de incubación de 6 a 10 días; en este intervalo de tiempo no se observan cambios en CCD (numero de componentes del extracto). Sin embargo como se observa en la figura 11, se obtiene el mayor rendimiento de extracto de la biomasa con una concentración de glucosa/oligoelementos $5X^1/_2X$ en un tiempo de 72 horas, no obstante y a pesar del buen rendimiento, no se observaron compuestos definidos en los cromatogramas de estos extractos. De igual forma se obtiene el mayor rendimiento de la extracción del caldo de fermentación, cuando se utiliza la concentración de 5X1X glucosa/oligoelementos, en un tiempo de 6 días (figura 12).

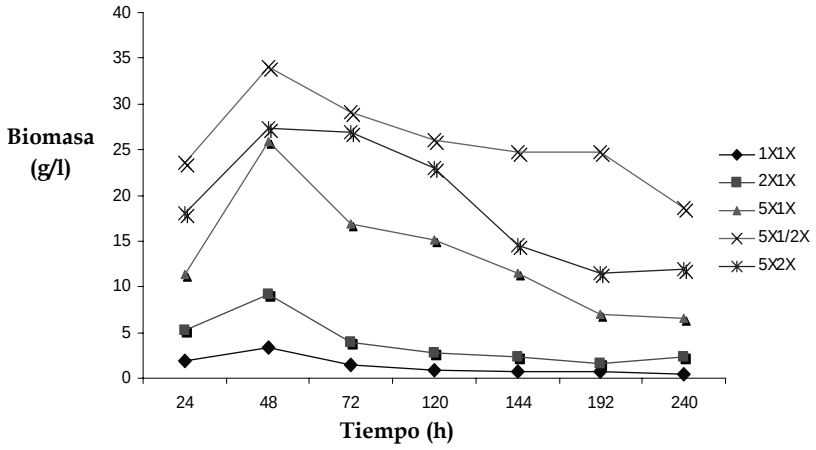


Figura 10. Biomasa, en gramos por litro de medio, con cinco concentraciones del medio mínimo.

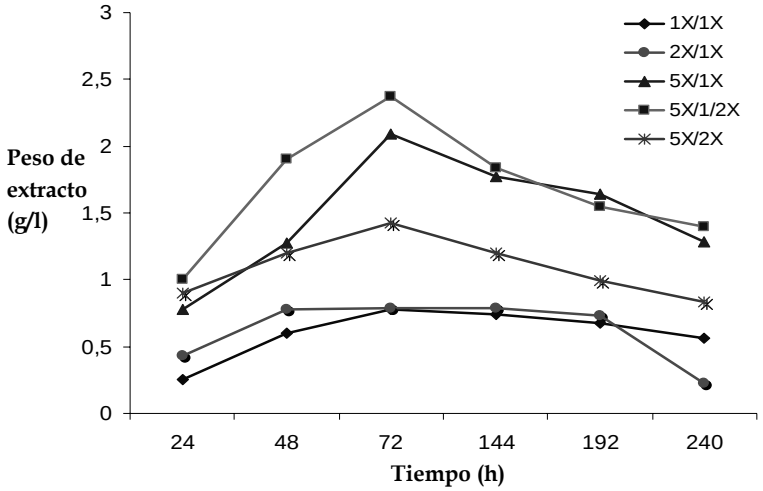


Figura 11. Peso de la extracción de biomasa, por litro de medio con cinco concentraciones del medio mínimo.

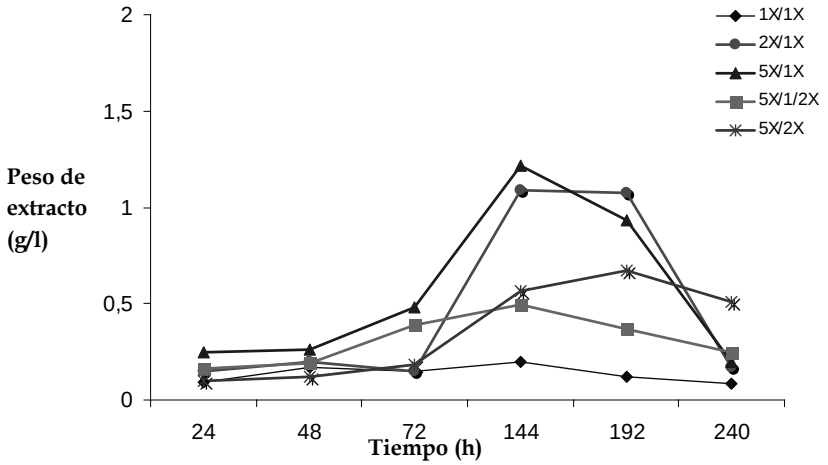


Figura 12. Peso de la extracción del caldo de fermentación, por litro de medio con cinco concentraciones del medio mínimo.

7.2 Cultivo masivo

En el primer día de incubación, se observaron conidióforos en la cepa CLS12, los cuales fueron aumentando en número en los días 2-4. Posteriormente, entre el 6º y 7º día, de incubación aparecieron cleistotecios y células de Hulle inmaduras, así como el pigmento rosa, que acompaña a estas estructuras. Al final de la incubación, se observaron hifas

maduras, conidióforos y esporas asexuales, cleistotecios y células de Hulle. Como se puede observar en la figura 13, en la cepa CLS2, *cfwA2,* se observó con el mismo tiempo, un patrón similar de crecimiento, aunque una numero menor de conidias y de cleistotecios, así como, una menor pigmentación.

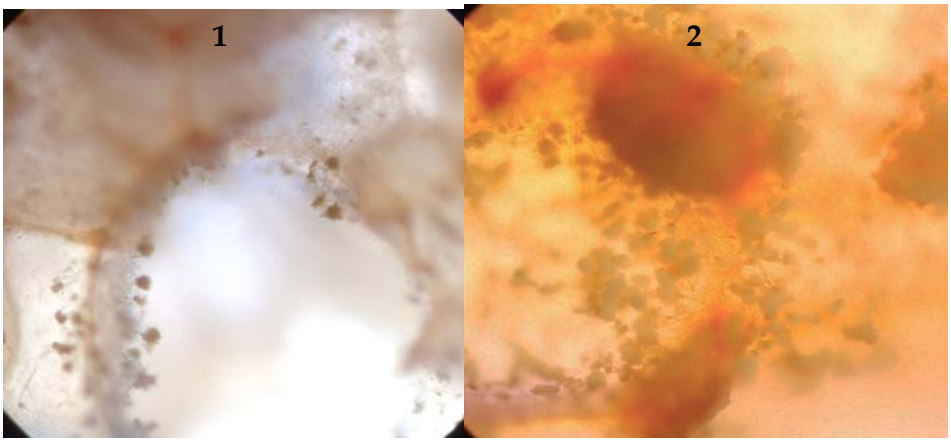
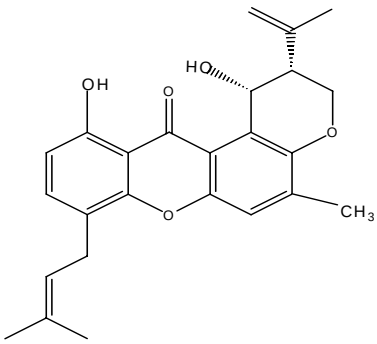


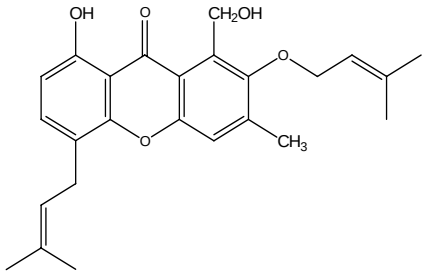
Figura 13. Fotografías del crecimiento de 7 días, sobre soporte sólido de: 1) cepa CLS2 (*cfwA2)* y 2) cepa CLS12 (*cfwA+).* En donde se aprecia una menor pigmentación y un menor numero de estructuras reproductivas en la cepa *cfwA2*.

7.3 Compuestos obtenidos

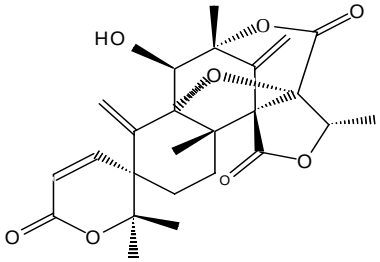
Del medio de fermentación, utilizando acetato de etilo como disolvente de extracción, se obtuvieron 16 gramos de extracto seco, de la cepa CLS12 (cfwA+), y 6 g de la cepa CLS2 (*cfwA2*). Asimismo mediante la extracción continua con metanol de la biomasa, se obtuvieron 26.5 g y 7 g de extracto seco respectivamente. Los extractos se fraccionaron y los compuestos se purificaron por cromatografía en columna como se mencionó en la parte experimental. En base a sus propiedades físicas y a sus datos espectroscópicos, se identificaron seis compuestos de la cepa silvestre, tres derivados de las rutas mixtas policétido e isoprenoide: shamixanthona (2), emericelina (3) y dehydroaustinol (5) y tres esteroles: ergosterol (1), peroxido de ergosterol (4) y cerevisterol (6). En la cepa *cfwA2* únicamente se aislaron e identificaron: ergosterol (1) y cerevisterol (6).



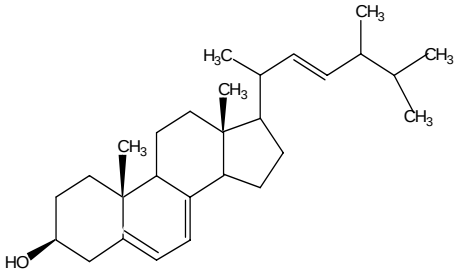
2



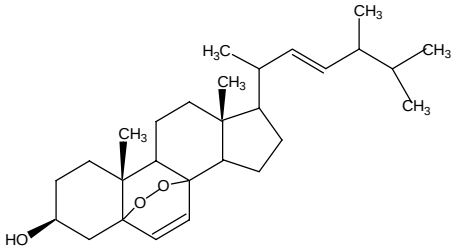
3



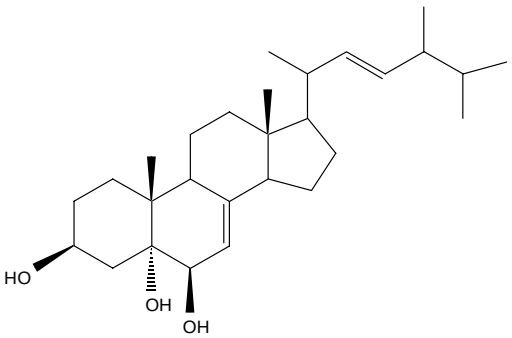
5



1



4



6

En la tabla 4 se enlistan los extractos y los compuestos obtenidos en orden creciente de polaridad de cada cepa. Como se puede apreciar, el rendimiento de la extracción, es

menor en la cepa CLS2 comparada con la cepa CLS12 (aproximadamente un 31 %), sin embargo, la producción de ergosterol fue un 48 % mayor en la cepa CLS2 (*cfwA*2). Por lo que podemos asumir que la diferencia en el peso de las extracciones entre las dos cepas, no se debe a una extracción deficiente en la cepa CLS2.

Tabla 4. Resumen de compuestos aislados en cada cepa

CLS12	Rendimiento	CLS2	Rendimiento
Extracto Acetato de Etilo	1.6 g/l	Extracto Acetato de Etilo	1.1 g/l
Extracto metanólico	2.6 g/l	Extracto metanólico	1.4 g/l
1 Shamixanthona	18 mg		
2 Emericelina	26 mg		
3 Ergosterol	35 mg	Ergosterol	52 mg
4 Peroxi-ergosterol	45 mg		
5 Dehydroaustinol	52 mg		
6 Cerevisterol	10 mg	Cerevisterol	8 mg
Glucopiranosa (α y β)	32 mg	Glucopiranosa (α y β)	24 mg

En los siguientes cromatogramas, se comparan los extractos con acetato de etilo de ambas cepas con los compuestos puros obtenidos de la cepa CLS12. Como se puede observar en 1 (revelada con luz UV, onda corta) y 3 (revelada con vapores de yodo), no se logran observar las manchas correspondientes de shamixantona (b) y emericelina (c), en el extracto completo de la cepa CLS2 (a y e). Asimismo en 2 (revelada con luz UV, onda corta) y 4 (revelada con vapores de yodo), no se observa la presencia de el peróxido de ergosterol (g) y el dehydroaustinol (h), pero si de ergosterol (f) en el extracto de CLS2.

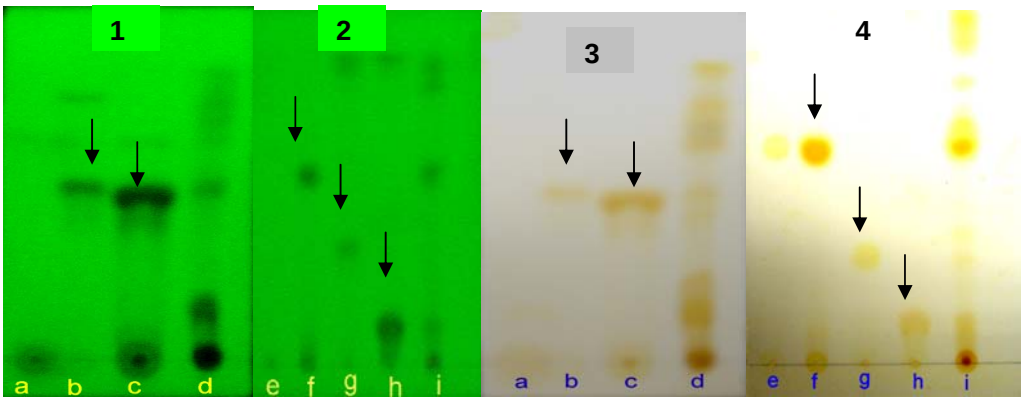


Figura 14. Comparación en CCD, de los extractos de las cepas CLS12 (*cfwA*⁻) y CLS2 (*cfwA*2), con los compuestos ya purificados. a **y** e**, extracto de la cepa CLS2;** b**, shamixantona;** c**, emericelina;** d **e** i**, extracto de CLS12;** f**, ergosterol;** g**, peroxi-ergosterol y** h**, dehydroaustinol. Los CCDs están corridos con Hexano-Acetato de etilo y revelados en luz ultravioleta onda corta 1 y 2, y vapores de yodo 3 y 4.**

En el cromatograma en CCD de la figura 43, se puede observar la presencia de cerevisterol (con flechas) en la cepa silvestre CLS12 (a) y en la cepa CLS2 (b) comparadas con un estándar de cerevisterol.

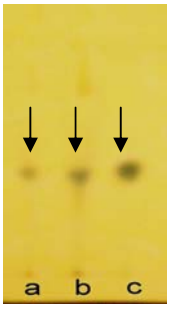


Figura 43. Cromatografía en capa fina en donde se puede observar la presencia de cerevisterol en fracciones sin purificar de las cepas silvestre o CLS12 (a) y CLS2 (b), junto a un estándar de cerevisterol (c). Reveladas en ácido fosfomolíbdico (al 10% en metanol).

7.4 Determinación de ácidos grasos

Las fracciones apolares eluídas con hexano, del extracto con acetato de etilo, de ambas cepas,se sometieron a derivatización, tomando como muestra 20 mg de cada fracción, para formarlos esteres de los ácidos grasos libres. La solución se hizo pasar por una columna para cromatografía gaseosa y posterior detección por espectrometría de masas, comparándose contra la base de datos (biblioteca) previamente establecida de esteres de ácidos grasos.

En la tabla 5, se resume el porcentaje de ácidos grasos obtenidos de la partición hexánica de ambas cepas. Como se puede observar sólo hay una diferencia significativa en el contenido de ácido linoléico entre las dos cepas. En total, el contenido de ácidos grasos es mas alto en la cepa *cfwA2,* lo que nos habla de que la biosíntesis de ácidos grasos no está afectada en esta cepa, y que la extracción con disolventes no fue deficiente.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos, de la partición hexánica de cada extracto, de las cepas silvestre CLS12, y *cfwA2* CLS2.

ÁCIDO GRASO	CLS12	CLS2
Palmítico	15.85	20.60
Linoléico	28.45	44.10
Oléico	20.10	18.80
Esteárico	12.10	9.90
TOTAL	76,5	93,4

7.5 Bioensayo

La co-inoculación de una cepa silvestre o de otras mutantes, junto a *cfwA2*, es capaz de revertir los defectos de la conidiación y de pigmentación a 37º C, indicando un fenómeno de alimentación cruzada (cross-feeding, figura 15), que induce tanto la formación de conidioforos como de precursores del pigmento.

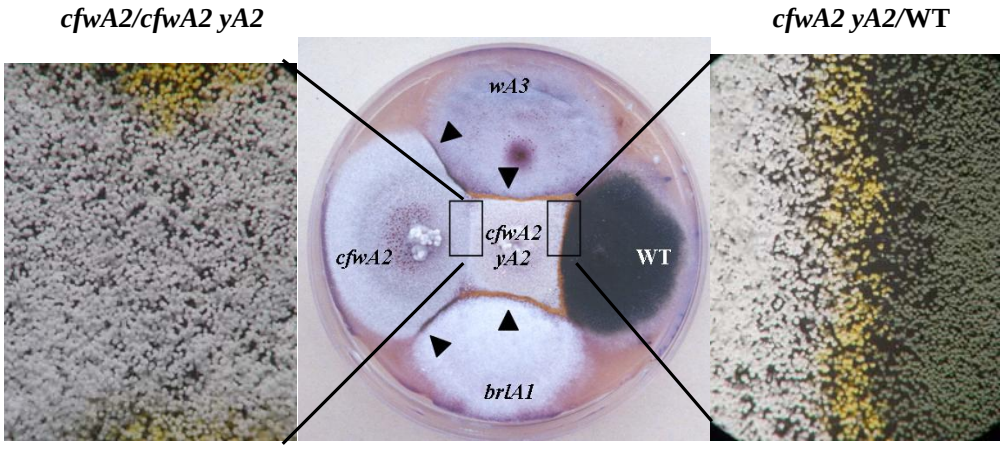


Figura 15. Cepa *cfwA2*, co-inoculada junto a dos mutantes regulatorias (*brlA1* y *wA3*) y una silvestre (WT), en donde se observan las bandas de conidióforos pigmentados (con triángulos).

Como ya se mencionó, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si los compuestos de la cepa "silvestre" (CLS12 *cfwA+*), que no están presentes en la mutante *cfwA2* (cepa CLS2), actúan como señales de inicio de la esporulación. Por lo tanto ya que la mutante *cfwA2*, no produjo shamixanthona, emericelina, dehydroaustinol y peroxi-ergosterol, probamos estos compuestos sobre una cepa *cfwA2* y sobre otras mutantes afectadas en la esporulación (*npgA*, *ΔfluG* y *FluF*).

En las figuras 16 y 17, se puede observar que no existen esporulación y/o pigmentación, entre los discos y el borde de la colonia, de cualquier cepa. Lo que indica que los compuestos aislados de la cepa "silvestre", no funcionan como señales inductoras de la esporulación.



Figura 16. Izquierda: Mutante *fluF*; a disco blanco; b shamixanthona; c emericelina; d dehydroaustinol; e peroxido de ergosterol. Derecha: Mutante *fluG*; a peroxido de ergosterol; b shamixanthona; c emericelina, d dehydroaustinol; e disco blanco. El tiempo de incubación es de 48 Hrs.

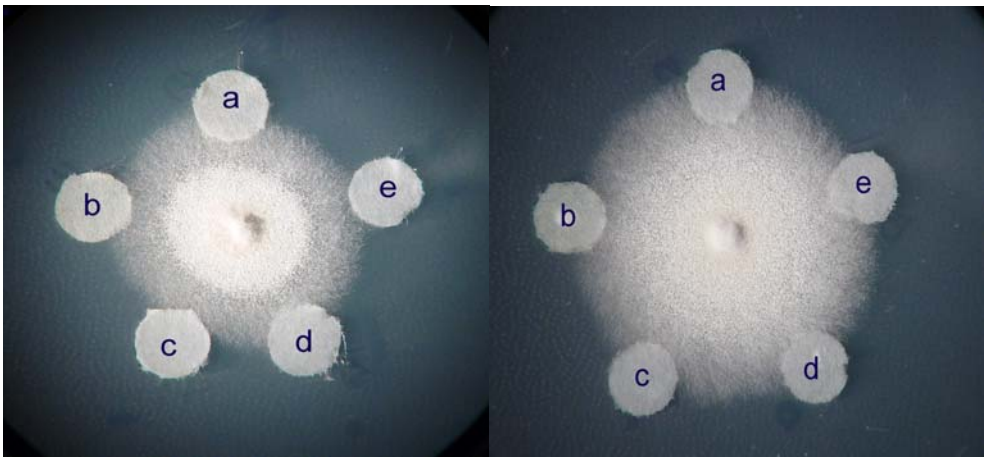


Figura 17. Izquierda: mutante *cfwA2*: a dehydroaustinol; b peroxiergosterol; c shamixanthona, d emericelina, e disco blanco. Derecha: mutante *npgA* a dehydroaustinol; b peroxiergosterol; c shamixanthona; d emericelina; e disco blanco. En ambas el tiempo de incubación es de 48hrs.

En un estudio previo se observó que el extracto completo (acetato de etilo) de la cepa CLS12 (*cfwA*+) fue capaz de inducir una ligera reducción en el crecimiento del micelio aéreo en *ΔfluG* y *cfwA2* a las 48 h de incubación (Márquez-Fernández et al, 2007), y un desarrollo de conidióforos incoloros en una cepa *cfwA2* después de 72 h de incubación. Lo que nos hace suponer que posiblemente en el extracto completo se encuentre algún factor inductor de la conidiación en baja concentración, ya que no fue aislado en el extracto con la metodología utilizada.

8. ASIGNACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

En la siguiente tabla se resumen algunas características físicas, de los compuestos aislados de la cepa CLS12, obtenidos en orden de polaridad:

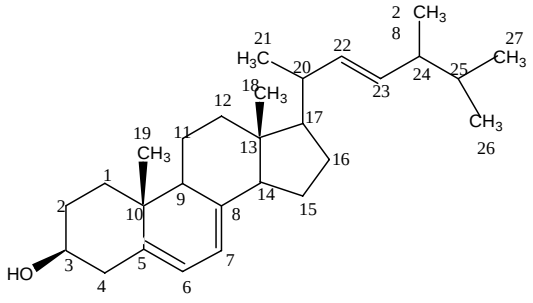
Tabla 6. Datos fisicoquímicos de los compuestos aislados de la cepa CLS12

Compuesto	Fracción	Punto de fusión °C	Solubilidad	Rf Hexano-A.Et	Revela en CCD
1	Hexano	166-170	Cloroformo	0.72; 7:3	Luz UV/I_2
2	95:5 Hex-A.Et.	124-126	Hexano	0.35; 9:1	Visible/UV
3	95:5 Hex-A.Et	95-98	Hexano	0.29; 9:1	Visible/UV
4	80:20 Hex-A.Et	154-156	Cloroformo	0.39; 7:3	I_2
5	70:30 Hex-A.Et	245-248	Acetona	0.23; 7:3	Luz UV 300 nm
6	50:50 Hex-A.Et	242-246	Metanol	0.2; 0:10	Fosfomolibdato/MeOH
7	Metanol		Agua	0.12; Metanol	

Una vez purificados, por cromatografía en columna y por cristalización con disolventes grado HPLC. Los compuestos obtenidos, fueron sometidos a análisis mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13. A continuación se describen los experimentos de RMN.

Compuesto 1

De los lavados, con hexano frío, del extracto de acetato de etilo, y posterior cristalización fraccionada, se obtuvieron 35 mg de un sólido cristalino e incoloro, el cual descompone con la luz. Con base a sus datos espectroscópicos y por comparación con una muestra auténtica determinamos que se trataba del ergosterol *(1)*.



1

En el espectro RMN ^{1}H (figura 19), se pueden asignar las siguientes señales: a 5.57 y 5.38 ppm dos picos, que integran cada uno para un protón, asignados a los protones vinílicos H-6 y H-7; a 5.22 ppm, una señal múltiple que integra para dos protones y que corresponden a los protones H-22 y H-23; a 3.63 ppm una señal compleja ancha, generada por el protón geminal a un grupo hidroxilo, H-3, dispuesto en β; en 2.48 y 2.28 ppm dos señales múltiples originadas por los protones H-4 y H-4'; a 1.04, 0.92, 0.82 y 0.83 ppm se distinguen cuatro señales dobles que integran cada una para tres protones, y que se asignaron a los protones de los grupos metilos H-21, H-28, H-27 y H-26; y finalmente, dos señales simples en 0.94 y 0.63 ppm, que también integran para tres protones cada una y que correspondieron a los protones metílicos, H-19 y H-18. Con el experimento COSY (Figura 20), se observaron principalmente las correlaciones homonucleares, entre los protones H-6 con H-7; y H-22 y H-23 con H-20 y H-24; y entre los protones H-3 con H-4.

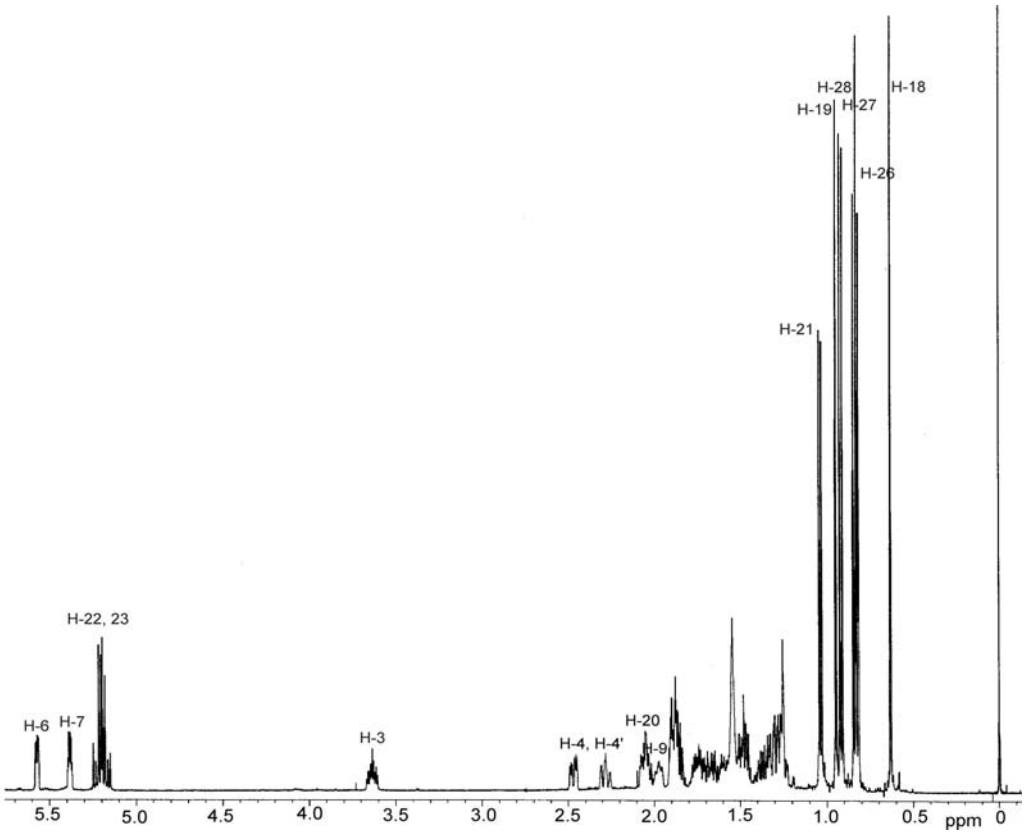


Figura 18. Espectro RMN¹H de ergosterol

En el espectro de RMN^{13}C desacoplado (figura 21), se observaron 28 señales. Destacándose a 141.2 y 139.6 ppm dos señales de los carbonos vinílicos cuaternarios C-5 y C-8. Valiéndose del experimento DEPT se lograron distinguir tres señales de carbonos cuaternarios en 141.2, 139.6 y 36. 9 ppm; doce señales de carbonos terciarios en 135.4, 131.8, 119.4, 116.1, 70.3, 55.6, 54.4, 46.1, 42.7, 40-2, 32.9 y 25.3 ppm; siete señales de carbonos secundarios en 40.7, 38.9, 38.2, 31.8, 29.6, 28.1 y 22.8; y en 20.96, 19.8, 19.5, 17.4, 16.1 y 11.9 ppm seis señales de grupos metilo.

Mediante el experimento HSQC (figura 22) se lograron asignar algunas señales por la correlación heteronuclear carbón-protón a un solo enlace, destacándose C-2, C-3 y los núcleos vinílicos C-6, C-7, C-22 y C-23. Finalmente, con el experimento HMBC (figura 23), se identificaron correlaciones entre núcleos carbón-protón a dos y tres enlaces, principalmente H-6 con C-8, H-7 con C-5, H-22 con C-20 y C-24. El total de las asignaciones se resume en la tabla 7.

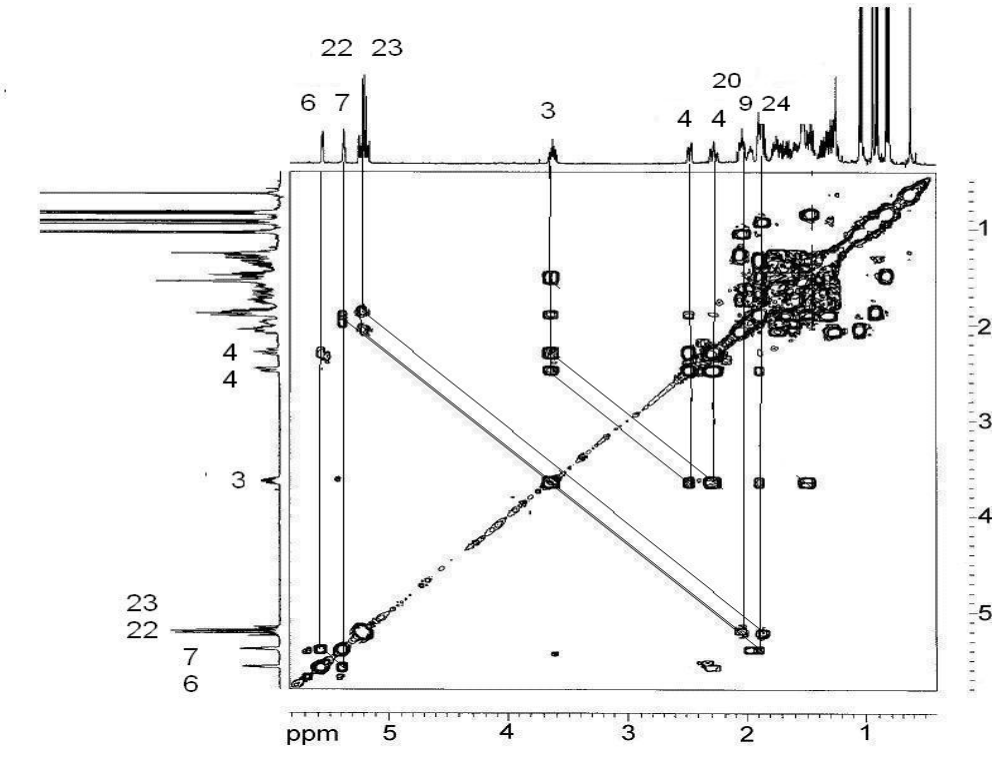


Figura 19. Experimento COSY de ergosterol

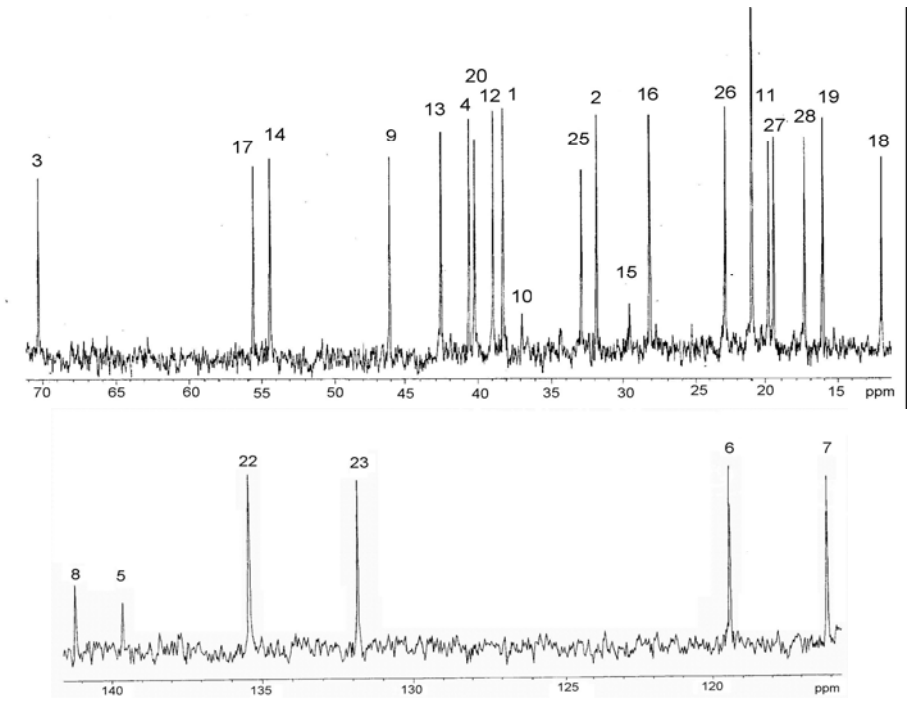


Figura 20. Espectro RMN^{13}C de ergosterol

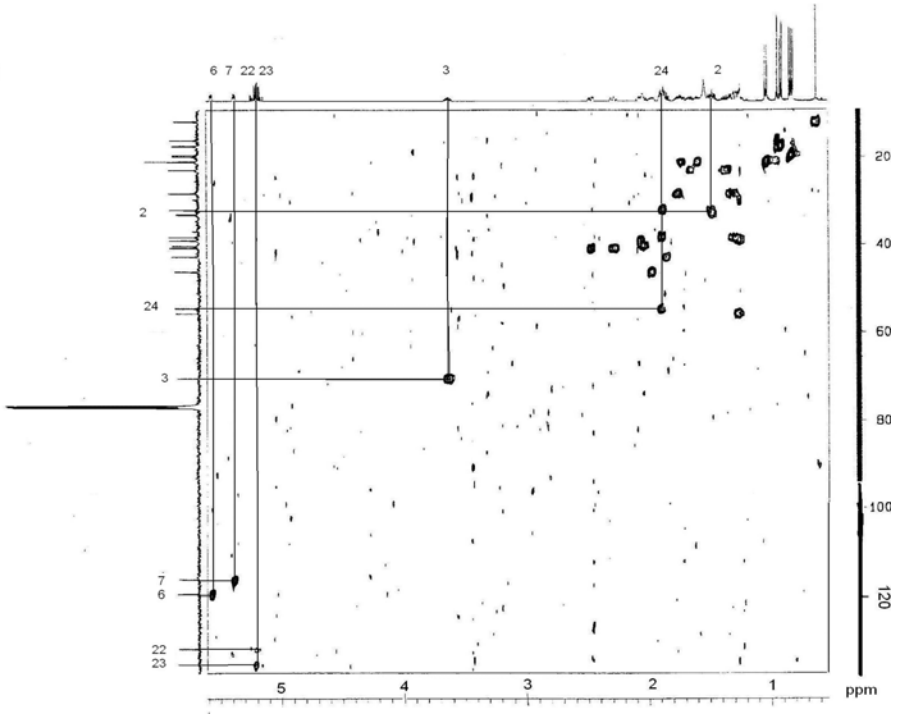


Figura 21. Experimento HSQC de ergosterol

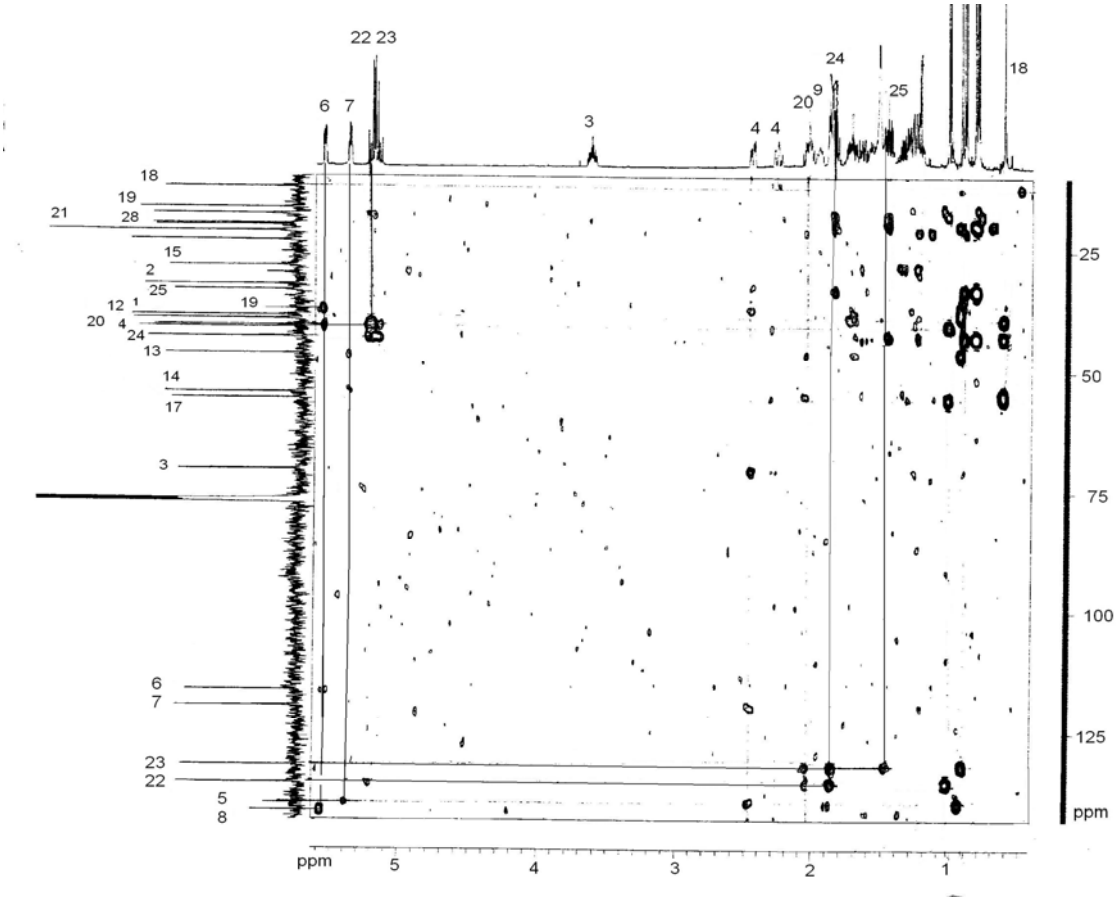


Figura 22. Experimento HMBC de ergosterol.

Tabla 7. Datos espectroscópicos RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de ergosterol (en $CDCl_3$ a 500 MHz, δ en ppm)

C	δ	Multiplicidad *	Conectividad $^{1}H/^{13}C$**	Multiplicidad ^{1}H ***	Acoplamiento $^{1}H/^{1}H$**	Correlación $^{13}C/^{1}H$ a 2, 3 y 4 enlaces
1	38.23	CH_2	-			H-19^{3}
2	31.87	CH_2	H-2 (δ, 1.75)	m	H-1, H-3	H-4^{3}
3	70.32	CH	H-3 (δ, 3.63)	m	H-2, H-4	H-4^{2}
4	40.67	CH_2	H-4 (δ, 2.48), H-4' (δ, 2.28)		H-3, H-6	
5	139.65	C	-			H-4^{2}, H-4'^{2}, H-19^{3}
6	119.44	CH	H-6 (δ, 5.57)	dd (2.4 y 5.7 Hz)	H-4, H-7	H-4^{3}
7	116.14	CH	H-7 (δ, 5.38)	q (2.8 y 5.6 Hz)	H-6, H-9	
8	141.21	C	-			H-6^{3}
9	46.11	CH	-		H-7	H-19^{3}
10	36.88	C	-			H-4^{3}, H-6^{3}, H-19^{2}
11	20.90	CH_2	H-11 (δ, 1.70)			
12	38.95	CH_2	H-12 (d, 2.08)			H-18^{4}
13	42.68	CH	-			H-18^{2}
14	54.41	CH	-			H-18^{3}
15	22.85	CH_2	-			
16	28.13	CH_2	-			
17	55.60	CH	-			H-21^{3}
18	11.90	CH_3	H-18 (δ, 0.63)	s		
19	16.14	CH_3	H-19 (δ, 0.94)	s		
20	40.26	CH	H-20 (δ, 2.05)	dq	H-22	H-18^{4}, H-21^{2}, H-22^{2}, H-23^{3}
21	20.96	CH_3	H-21 (δ, 1.03)	d		
22	135.42	CH	H-22 (δ, 5.21)	dd	H-20, H-23	H-20^{2}, H-21^{3}, H-24^{4}
23	131.84	CH	H-23 (δ, 5.22)	dd	H-22, H-24	H-20^{3}, H-21^{4}, H-24^{2}, H-28^{3}
24	25.30	CH	H-24 (δ, 1.87)	dq	H-23	H-22^{3}, H-26^{3}, H-27^{3}, H-28^{2}
25	32.95	CH	H-25 (δ, 1.42)	m	H-26, H-27	H-24^{2}, H-26^{2}, H-27^{2}, H-28^{3}
26	19.49	CH_3	H-26 (δ, 0.82)	d	H-25	H-24^{3}, H-25^{2}, H-27^{3}
27	19.80	CH_3	H-27 (δ, 0.83)	d	H-25	H-24^{3}, H-25^{2}, H-26^{2}, H-28^{3}
28	17.45	CH_3	H-28 (δ, 0.92)	d	H-28	H-23^{2}, H-26^{3}, H-27^{3}

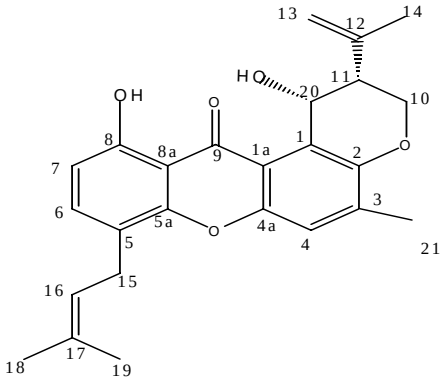
* La multiplicidad es a partir del DEPT ^{13}C

** Las asignaciones fueron confirmadas por los experimentos ^{1}H COSY, DEPT, HSQC, HMQC y HMBC.

*** Multiplicidad a partir de experimento $^{1}HNMR$. Las constantes de acoplamiento de los protones en Hz (*J*).

Compuesto 2

En las fracciones que se eluyeron con hexano-acetato de etilo 95:5, se obtuvo un sólido amarillo, el cual, en base a sus datos espectroscópicos comparados con la literatura, resultó ser shamixantona *(2)* (Chexal *et al*, 1974).



2

En el espectro de RMN^{1}H (Figura 23) realizado en $CDCl_3$, se aprecian: dos dobletes a 7.44 y 6.74 ppm, con una constante de acoplamiento de 4 Hz cada una, correspondientes a los protones aromáticos H-6 y H-7; una señal singulete en 7.29 ppm asignándose al protón aromático H-4; dos señales múltiples a 5.42 y 5.31 ppm que integran para un protón cada una y que correspondieron a H-20 y H-16 respectivamente; en 5.05 ppm, aparece una señal doble, que integró para un protón, la cual fue intercambiable con óxido de deuterio (D_2O) y que corresponde al grupo hidroxilo en la posición 20; los protones metilénicos exocíclicos H-13a y H-13b aparecieron en 4.80 y 4.59 ppm; mientras que los protones H-10a y H-10b se observaron a 4.42 y 4.35 ppm como señales doble de dobles, con constantes de acoplamiento de 1.8, 3.5, 10.8 y 3.0 y 10.8 Hz, respectivamente. En 3.50 y 2.76 ppm aparecieron los protones H-15 y H-11 como señales triple y singulete; y finalmente, los protones metílicos H-21, H-14, H-19 y H-18, se observaron como señales singuletes a 2.35, 1.84, 1.79, 1.75 ppm.

En el experimento COSY (figura 24), se apreciaron principalmente las correlaciones homonucleares entre: los protones aromáticos H-6 y H-7; entre los protones H-10 y H-11; H-10 y H-20; H-13a y H-13b con H-14; H-15 con H-16; y H-20 con H-11.

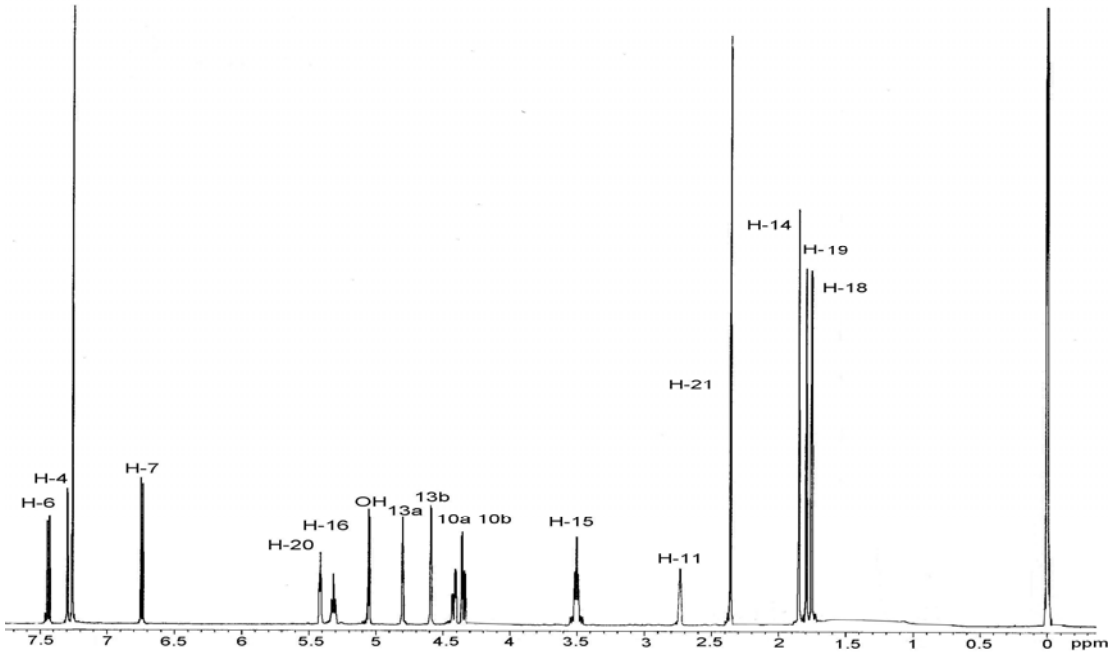


Figura 23. Espectro RMN^{1}H de shamixantona.

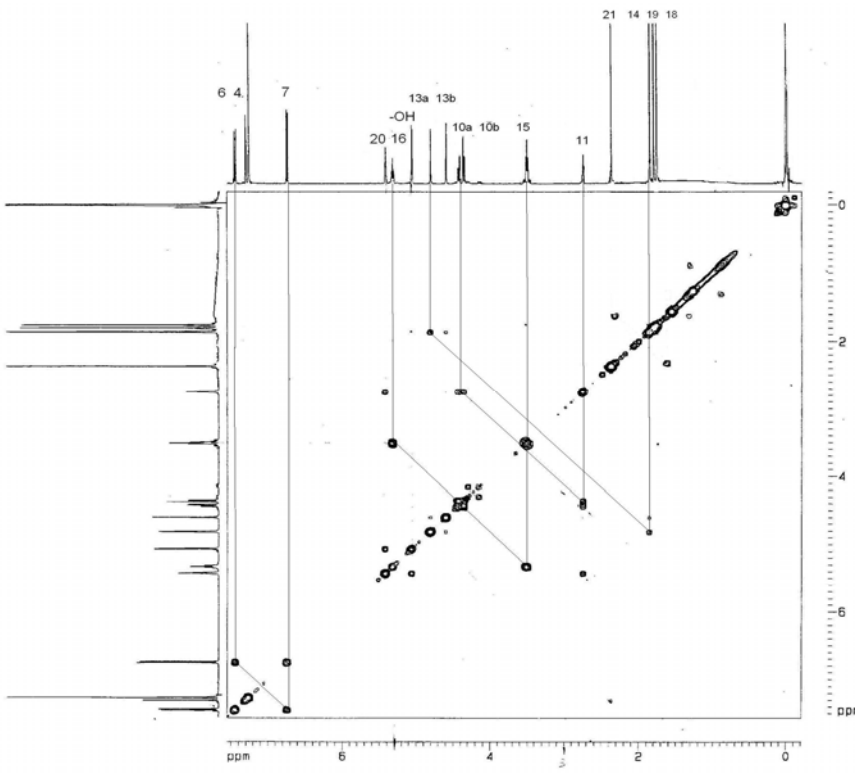


Figura 24. Experimento COSY de shamixantona.

En el espectro de RMN^{13}C desacoplado, en $CDCl_3$ **(**Fig. 25), se observaron 25 señales: sobresaliendo a 184.5 ppm, una señal correspondiente al grupo carbonilo de la cetona en posición 9, y otra a 159.7 ppm del carbono aromático unido a oxígeno (C-8); de esta forma, con el experimento DEPT, se determinaron: diez carbonos cuaternarios, en 153.5, 152.3, 149.5, 145.0, 142.6, 134.0, 133.5, 118.8, 117.0 y 108.5 ppm; seis carbonos terciarios a 136.6, 121.7, 119.3, 109.7, 63.3 y 45.0 ppm; dos carbonos secundarios a 112.3 y 64.6 ppm y cuatro carbonos primarios a 22.6, 25.8, 17.8 y 17.4 ppm.

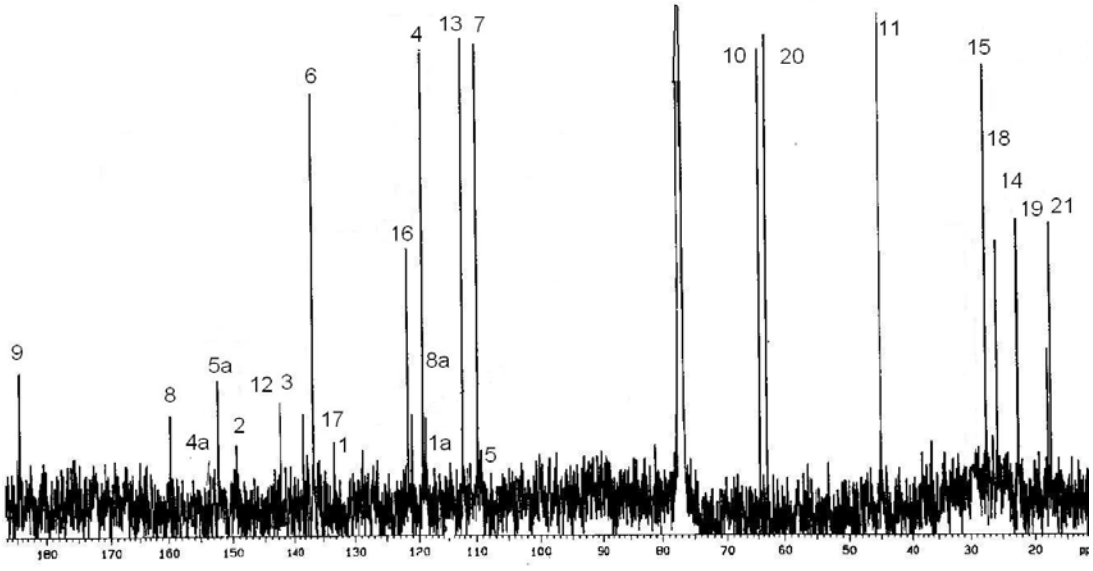


Figura 25. Espectro C^{13} de shamixantona

Mediante la correlación heteronuclear entre carbón-protón a un enlace (HSQC, figura 26), se asignaron la mayoría de los protones y carbonos, destacándose las señales originadas por: los núcleos aromáticos C-6, C-4 y C-7; los vinílicos C-13 y C-16; de los metilenos C-10 y C-15; los carbonos primarios C-11 y C-20; y los metilos C-14, C-18, C-19 y C-21. Con el experimento HMBC (figura 28), se logró confirmar la asignación correcta carbón-protón a dos y tres enlaces como, las correlaciones entre H-6 con C-5a, C-8 y C-15; H-7 con C-5 y C-8^{a}; H-10 con C-12; H-21 con C-4; H-18 con C-16 y C-17 (tabla 8).

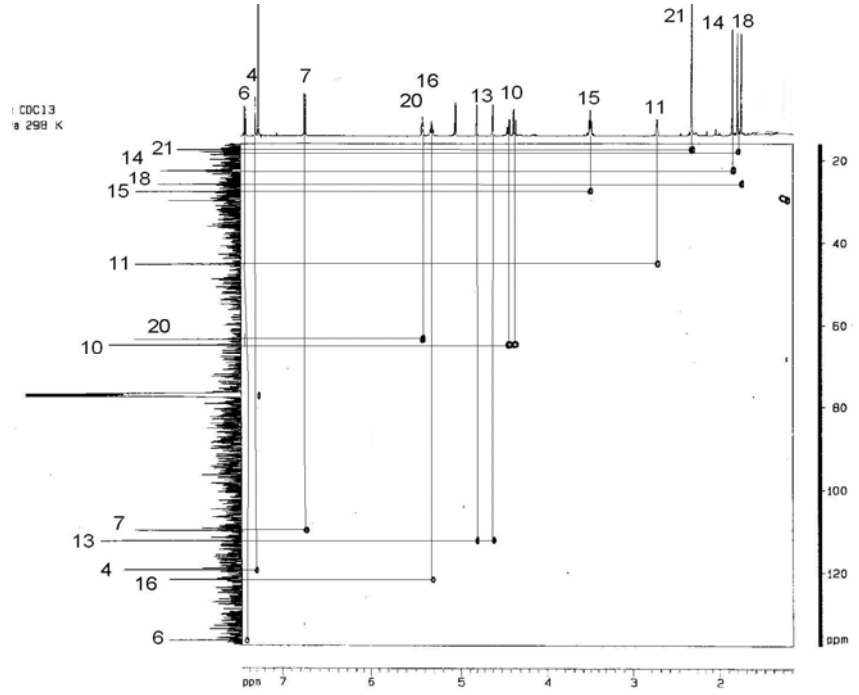


Figura 26. Experimento HSQC de shamixantona.

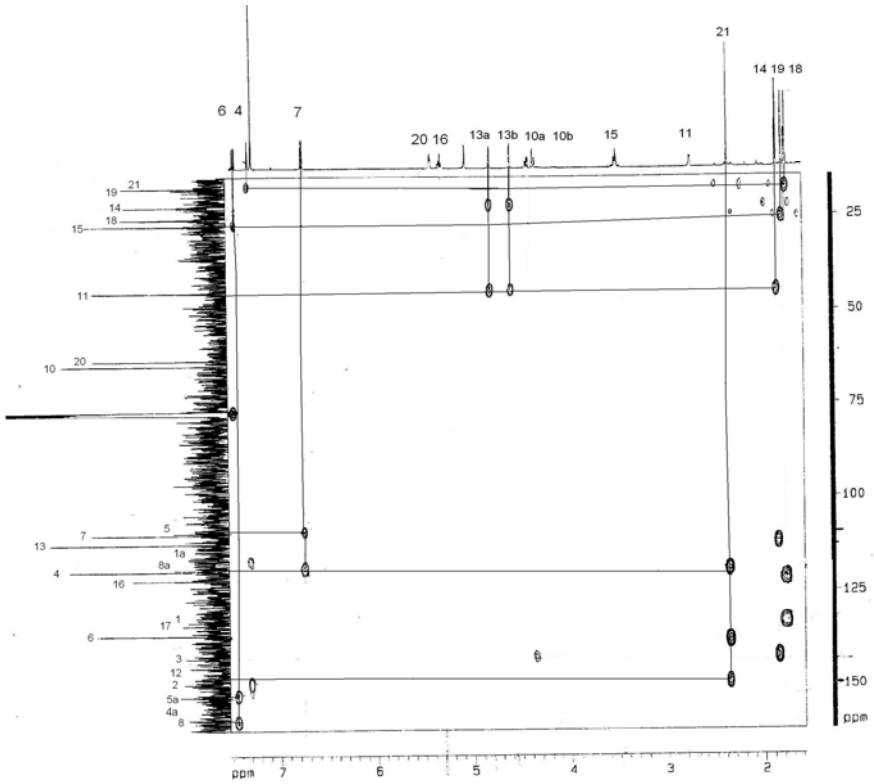


Figura 27. Experimento HMBC de shamixantona.

Tabla 8. Datos espectroscópicos RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de shamixantona (en $CDCl_3$ a 500 MHz, δ en ppm).

C	δ	Multiplicidad *	Conectividad $^{1}H/^{13}C$**	Multiplicidad NMR ^{1}H ***	Acoplamiento $^{1}H/^{1}H$**	Correlación $^{13}C/^{1}H$ a 2, 3 y 4 enlaces
1	133.5	C				
1[a]	117.0	C				
2	149.5	C				H-4[3] H-21[3]
3	142.6	C				H-21[2]
4	119.3	CH	H-4 (δ , 7.29)	s		H-21[3]
4[a]	153.5	C				H-21[4]
5	108.1	C				H-7[3]
5[a]	152.3	C				H-6[3]
6	136.6	CH	H-6 (δ, 7.44)	d (4 Hz)	H-7	
7	109.7	CH	H-7 (δ , 6.74)	d (4 Hz)	H-6	
8	159.7	C				H-6[3]
8[a]	118.8	C				H-7[3]
9	184.5	C				
10	64.6	CH2	H-10a (δ 4.42); H-10b (δ, 4.35)	d (7.5 Hz) ddd (1.3, 3.4, 10.8) dd (3.0, 10.8)	H-10b, H-11 H-10a, H-11	
11	45.0	CH	H-11 (δ, 2.73)	d (3.4)	H-10, H-20	H-13a[3] H-13b[3] H-14[3]
12	145.0	C				H-10[3], H-14[2]
13	112.3	CH2	H-13a (δ, 4.80); H-13b (δ, 4.59)	t (1.4, 0.7 Hz) d (0.7 Hz)	H-13b, H-14 H-13a, H-14	H-14[3]
14	22.6	CH3	H14 (δ,1.84)	s		H-13a[3], H-13b[3]
15	27.5	CH	H-15 (δ, 3.5)	d (7.5 Hz)	H-16	H-6[3]
16	121.7	CH	H-16 (δ , 5.31)	t (7.4, 1.4 Hz)	H-15	H-18[3], H-19[3]
17	134.0	C				
18	25.8	CH3	H-18 (δ, 1.75)	s	H-19	
19	17.8	CH3	H-19 (δ , 1.79)	s	H-18	
20	63.3	CH	H-20 (δ, 5.41)	t (3.4, 1.13 Hz)	H-11, -OH	
21	17.4	CH3	H-21 (δ, 2.35)	s		H-4[3]
H-O-R			δ, 5.05	d (3.4 Hz)	H-20	

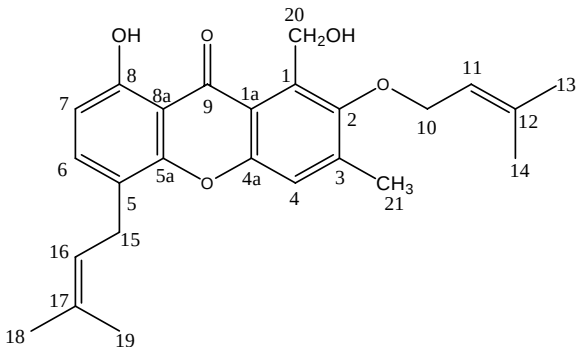
* La multiplicidad es a partir del DEPT ^{13}C.

** Las asignaciones fueron confirmadas por los experimentos ^{1}H COSY, DEPT, HSQC, HMQC y HMBC.

*** Multiplicidad a partir de experimento $^{1}HNMR$. Las constantes de acoplamiento de los protones en Hertz (*J*).

Compuesto 3

En las fracciones obtenidas con hexano-acetato de etilo 95:5, se obtuvo un sólido cristalino amarillo, soluble en cloroformo, el cual por sus características espectroscópicas, comparadas con la literatura se determinó que se trataba de emericelina *(3)* (Ishida M. *et al*., 1975a y b).



3

En el experimento RMN^{1}H a 500 MHz (Figura 28), se observaron tres señales en la región de protones aromáticos, una simple a 7.34 ppm de H-4; y las otras dos a 7.46 y 6.75 ppm que aparecen como dobles, con una constante de acoplamiento de 8.5 Hz y que integran cada una para un protón, atribuidas a H-6 y H-7; en la zona de protones vinílicos se observaron a 5.63 y 5.31 ppm dos señales múltiples que integran cada una para un protón y que son generadas por H-11 y H-16 de las cadenas isoprenilo; en 5.10 ppm se observa una señal doble que integra para dos protones, y con *J* =8.0 Hz, del grupo metilénico geminal a un grupo hidroxilo; a 4.46 y 3.51 ppm aparecieron dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 7.5 Hz, que integran para dos protones cada una, comprendientes a los grupos metilénicos H-10 y H-15; un singulete a 7.47 y una señal triple a 4.48 (*J* = 8.0 Hz), ambas intercambiables con D_2O, fueron asignadas a los protones de los grupo hidroxilos, aromático y alílico, respectivamente; por último se observaron cinco señales simples que integran cada una para tres protones, a 2.48, 1.82, 1.80, 1.78 y 1.74 ppm, asignadas a los protones de los grupos metilo H-21, H-14, H-13, H-19 y H-18.

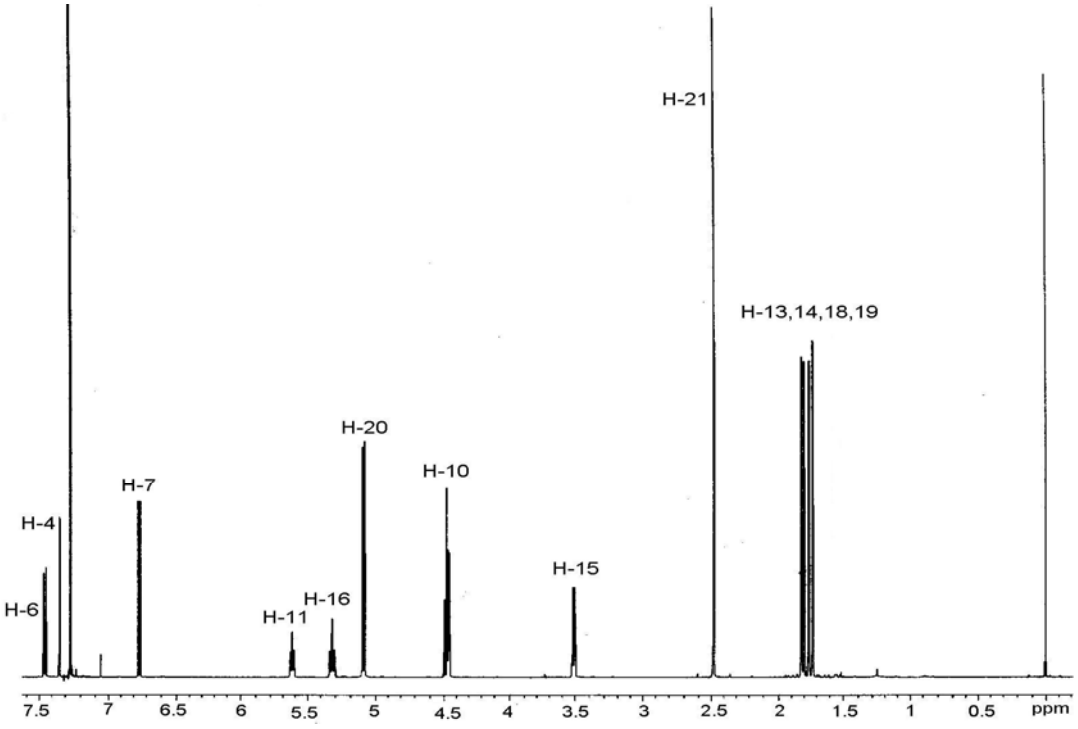


Figura 28. Espectro RMN^{1}H, de emericelina

En el experimento de dos dimensiones COSY (figura 29), se aprecian principalmente la correlación homonuclear entre los protones aromáticos H-6 y H-7; entre los protones metilénicos H-10 con H-11; y H-15 con H-16; finalmente la correlación entre los protones H-20 con el protón del hidroxilo. En el espectro de RMN^{13}C desacoplado (figura 30), se apreciaron 25 señales, entre las que destacaron a 185.0 ppm la señal del carbonilo C-9; asimismo con el experimento DEPT se determinó la existencia de once carbonos cuaternarios en 159.8, 153.8, 152.8, 152.5, 142.5, 138.9, 134.1, 133.1, 118.7, 117.8 y 108.7; cinco señales de carbonos terciarios en 136.8, 121.5, 119.5, 119.3 y 109.8 ppm; a 72.1, 56.9 y 27.3 ppm tres señales de carbonos secundarios; y finalmente cinco señales de carbonos primarios 25.7, 25.6, 17.9, 17.7, y, 17.6 ppm.

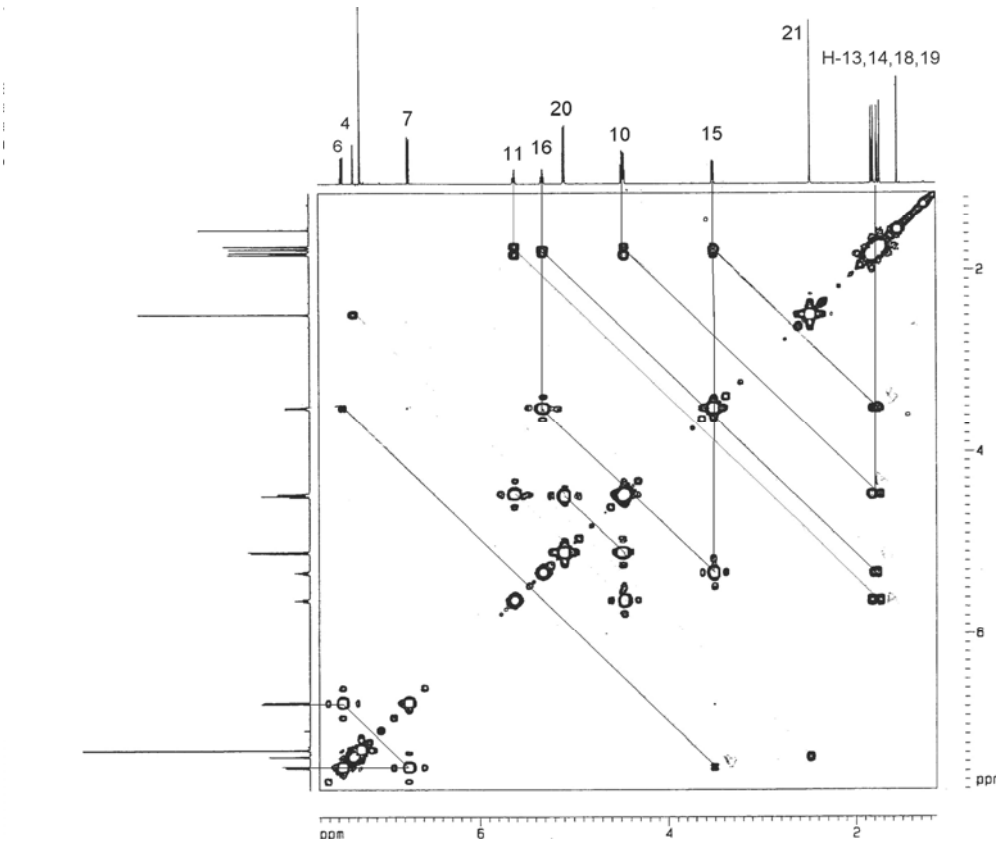


Figura 29. Experimento COSY de emericelina

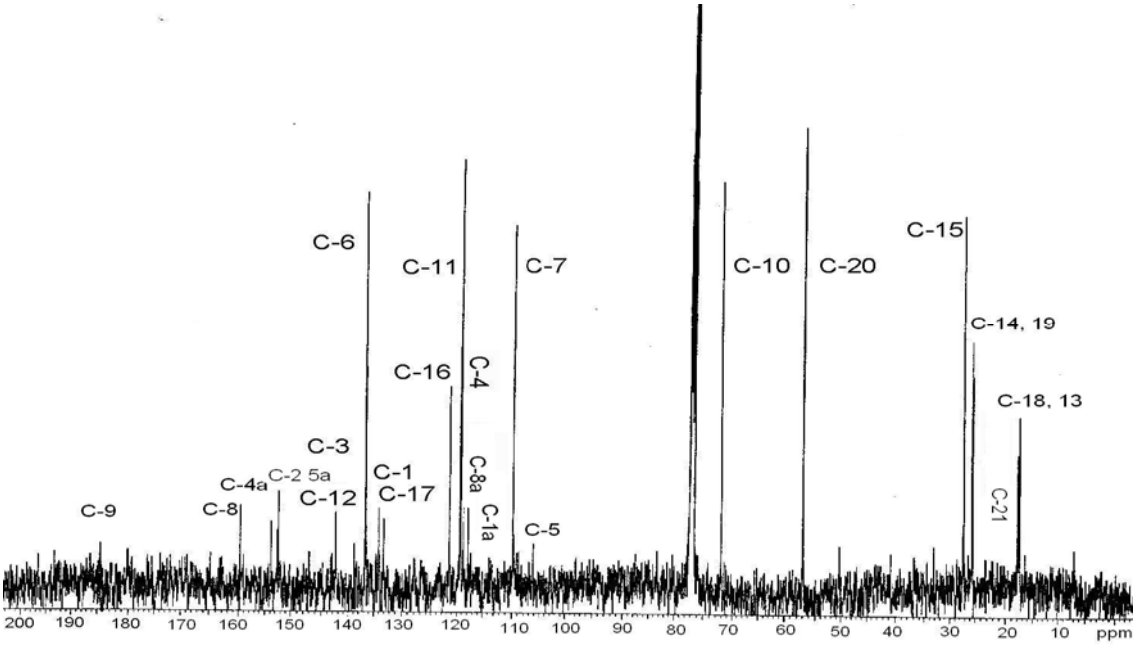


Figura 30. Espectro RMN^{13}C, de emericelina

En el experimento HSQC (figura 30) se lograron identificar las correlaciones entre carbón-protón de C-6, C-7, C-4, C-11, C-16 y C-20 principalmente. Finalmente, utilizando la relación carbón-protón a dos y tres enlaces, (experimento HMBC, figura 31), pudimos asignar correctamente la mayoría de carbonos, destacando las correlaciones entre, H-6, C-5 y C-8, H-4, C-1ª y C-2; H-7, C8 y C-8ª, H-20 y C-1, H-10 y C-11, H-15 con C-6, C-5ª y C-16; H-21 con C-4 y H-13 con C-12 principalmente (Tabla 9).

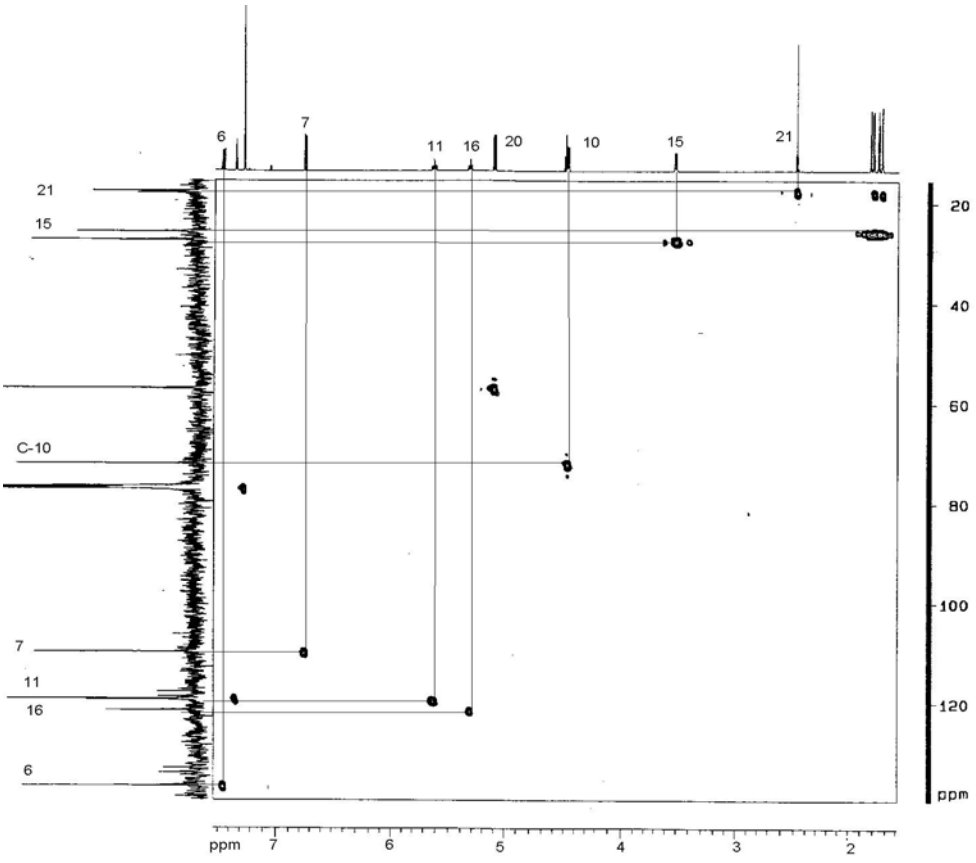


Figura 31. Experimento HSQC de emericelina

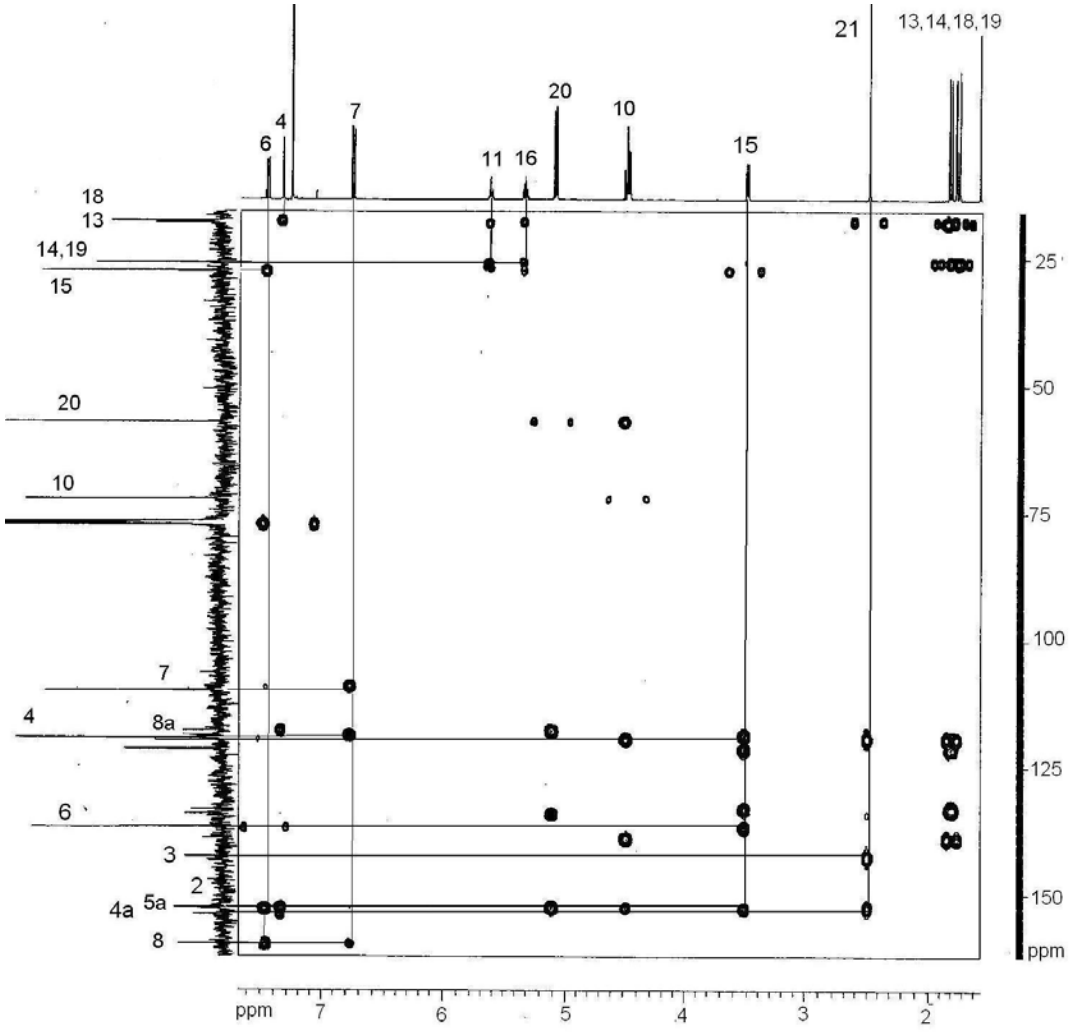


Figura 32. Experimento HMBC de emericelina

Tabla 9. Datos espectroscópicos RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de emericelina (en $CDCl_3$ a 500 MHz, δ en ppm)

C	δ	Multiplicidad *	Conectividad $^{1}H/^{13}C$**	Multiplicidad NMR ^{1}H ***	Acoplamiento $^{1}H/^{1}H$**	Correlación $^{13}C/^{1}H$**, a 2, 3 y 4 enlaces
1	134.1	C				H-20[2]
1[a]	117.8	C				H-4[3]
2	152.8	C				H-4[3], H-10[3], H-20[3], H-21[3]
3	142.5	C				H-21[2]
4	119.3	CH	H-4 (δ , 7.34)	s	H-21	H-21[3]
4[a]	153.8	C				H-4[2]
5	108.7	C				H-7[3]
5[a]	152.5	C				H-6[3], H-15[3]
6	136.8	CH	H-6 (δ, 7.46)	d (8.5 Hz)	H-7, H-15	H-15[3]
7	109.8	CH	H-7(δ, 6.75)	d (8.5 Hz)	H-6	
8	159.8	C				H-6[3], H-7[2]
8[a]	118.7	C				H-7[3]
9	185.0	C				
10	72.09	CH2	H-10 (δ, 4.46)	d (7.5 Hz)	H-11, H-13, H-14	
11	119.5	CH	H-11 (δ, 5.63)	m (7.5, 4.5, 3.0, 1.5 Hz)	H-10, H-13, H-14	H-10[2]
12	138.9	C				H-10[3]
13	17.7	CH3	H-13 (δ, 1.80)	s		H-11[3], H-14[3]
14	25.7	CH3	H-14 (δ, 1.82)	s	H-10, H-11	H-11[3], H-13[3]
15	27.3	CH2	H-15 (d, 3.51)	d (7.5 Hz)	H-16, H-18, H-19	H-6[3], H-16[2]
16	121.5	CH	H-16 (δ, 5.31)	m (7.5, 4.5, 3.0, 1.5 Hz)	H-15, H-18	H-15[2], H-193
17	133.1	C				H-15[3], H-18[2], H-19[2]
18	17.6	CH3	H-18 (δ,1.74)	s	H-15, H-16	H-16[3], H-19[3]
19	25.6	CH3	H-19 (δ, 1.78)	s	H-15, H-16	H-16[3]
20	56.9	CH2	H-20 (δ, 5.10)	d (8.0 Hz)	-OH	
21	17.9	CH3	H-21 (δ, 2.48)	s		H-4[3]
H-O-R			δ, 4.48	t (8.0 Hz)	H-20	
H-O-Ar			δ, 7.47	s		

* La multiplicidad es a partir del DEPT ^{13}C.
** Las asignaciones fueron confirmadas por los experimentos ^{1}H COSY, DEPT, HSQC, HMQC y HMBC.
*** Multiplicidad a partir de experimento ^{1}HNMR. Las constantes de acoplamiento de los protones en Hertz (*J*).

Compuesto 4

En las fracciones obtenidas con hexano-acetato de etilo 8:2, purificamos un sólido blanco en forma de agujas, el cual por sus características fisicoquímicas, y al ser comparado en CCD, con una muestra auténtica, se determinó que se trataba de peróxido de ergosterol *(4)*, el cual fue confirmado por RMN^{1}H (figura 33). En este experimento, se pueden observar a 6.54 y 6.27 ppm, dos señales dobles que integran para los protones vinílicos H-6 y H-7 del anillo B; a 5.19 ppm una señal compleja que integra para los dos protones vinílicos H-22 y H-23; en 3.98 ppm una señal simple ancha originada por el protón H-3, en

posición β con respecto al grupo hidroxilo; finalmente los cinco grupos metilo presentes en la molécula se observan como cuatro dobletes y dos señales simples a 1.0, 0.91, 0.83, 0.81, 0.90 y 0.82 ppm que corresponden a H-21, H-19, H-28, H-27, H-26 y H-18 respectivamente; lo cual concuerda con lo citado en la literatura (Trigos y Ortega-Regules, 2002).

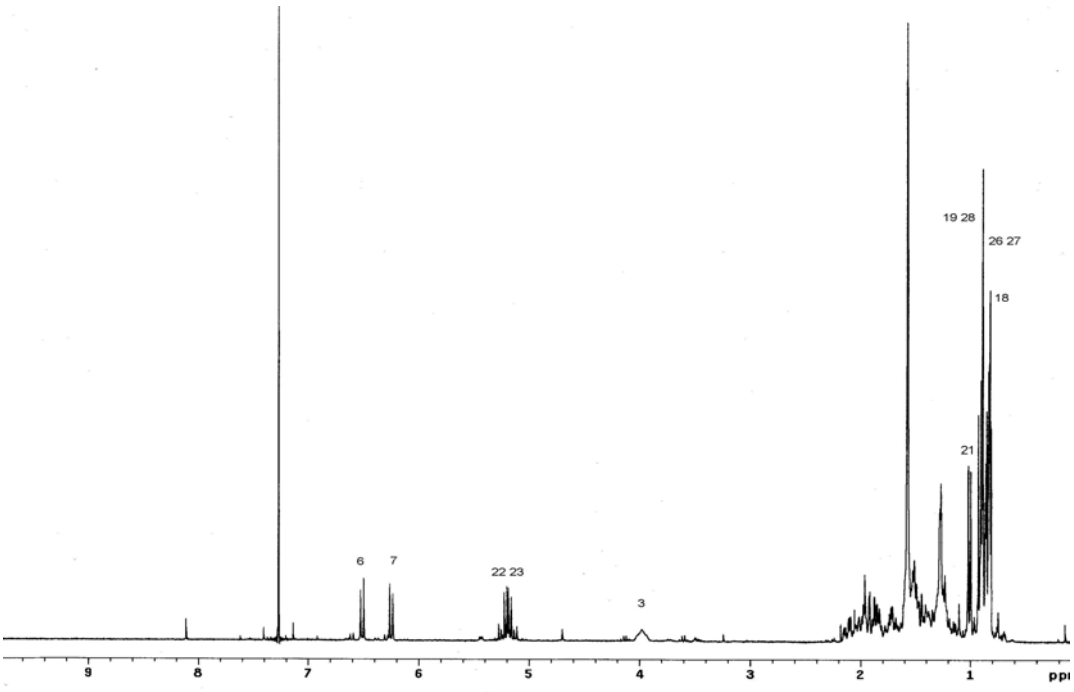
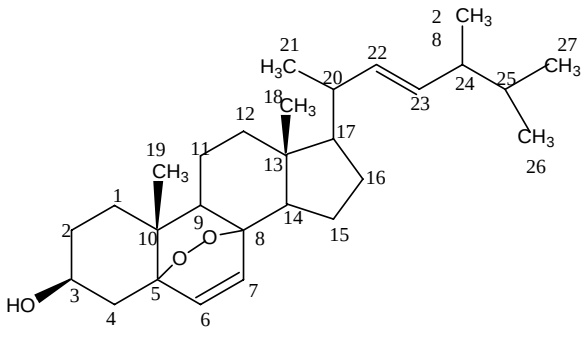


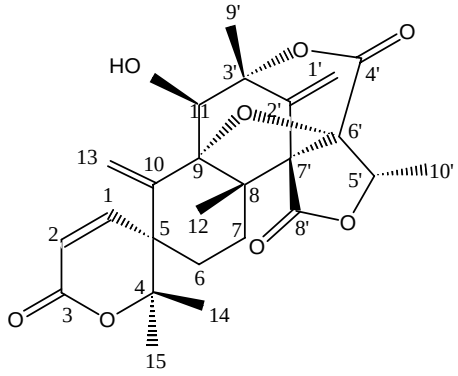
Figura 33. Espectro RMN1H de peroxi-ergosterol



4

Compuesto 5

En las fracciones obtenidas con hexano-acetato de etilo 7:3, se aisló un sólido cristalino e incoloro, parcialmente soluble en cloroformo y soluble en acetona, el cual por sus datos espectroscópicos se determinó que se trataba de dehidroaustinol *(5) (*Maebayashi *et al*, 1982; Geris dos Santos, *et al* 2003). Su estructura fue confirmada por difracción de rayos X, en un difractómetro Bruker-Apex (Figura 39 y tabla 10).



5

En el espectro de RMN^{1}H (figura 34), se asignaron las siguientes señales: a 6.90 y 5.91 ppm dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 10.3 Hz, generadas por los protones vinílicos H-1 y H-2; a 6.33, 5.77, 5.84 y 5.67 ppm cuatro señales simples originadas por los protones vinílicos exocíclicos H-13a, H-13b, H-1'a y H-1'b respectivamente; a 5.27 ppm una señal cuádruple que integra para un protón y con *J* =6.8 Hz, que se asignó a el protón H-5'; a 4.37 ppm una señal doble con *J* =4.3 y que integra para el protón geminal al grupo hidroxilo H-11; a 2.30 ppm se observó una señal doble con *J* =4.3, intercambiable por D_2O, originada por el protón de grupo hidroxilo; a 2.1 y 1.34 dos señales múltiples que integran cada una para un protón, con constantes de acoplamiento de 4.0, 13.0 y 27.2, y 3.0 y 13.0 Hz respectivamente, y que se asignaron a los protones H-7a y H-7b; otras dos señales múltiples en 1.78 y 1.72 ppm, con *J* = 4.0,13.0 y 27.2 Hz, que integran cada una para un protón fueron asignadas a H-6b y H-6a; finalmente cuatro señales simples y una doble en 1.71, 1.53, 1.51, 1.27 y 1.65 (*J* = 6.8 Hz), que integran cada una para tres protones son asignadas a los grupos metilo 9', 14, 15, 12 y 10' respectivamente.

En el experimento COSY (figura 35) se observaron las correlaciones entre los protones H-1 y H-2; entre H-6 y H-7; H-11 con el protón del hidroxilo; H-14 con H-15; y H-5′ con H-10′. En el espectro de RMN^{13}C desacoplado (figura 36), se observaron 25 carbonos, entre los que destacan a 169.0, 167.2 y 163.5 ppm las señales de tres grupos carbonilo (C-4′, C-8′ y C-3). En el experimento HMQC (figura 37), se observaron las correlaciones carbón-protón a un solo enlace de C-1, C-13, C-2, C-1′, C-5′, C-11, C-6, C-7, C-9′, C-10 y C-12. Las asignaciones de los carbonos se confirmaron con el experimento HMBC (figura 38), identificándose las correlaciones carbón-protón a dos y tres enlaces, de H-1 con C-5, C-3 y C-4; H-13 con C-5, C-9 y C-10; H-2 con C-3 y C-5; H-1′ con C-7′, C-3′ y C-2′; H-9′ con C-2′, H-10′ con C-5′ y H-12 con C-7, C-9 y C-7′ principalmente (tabla 11).

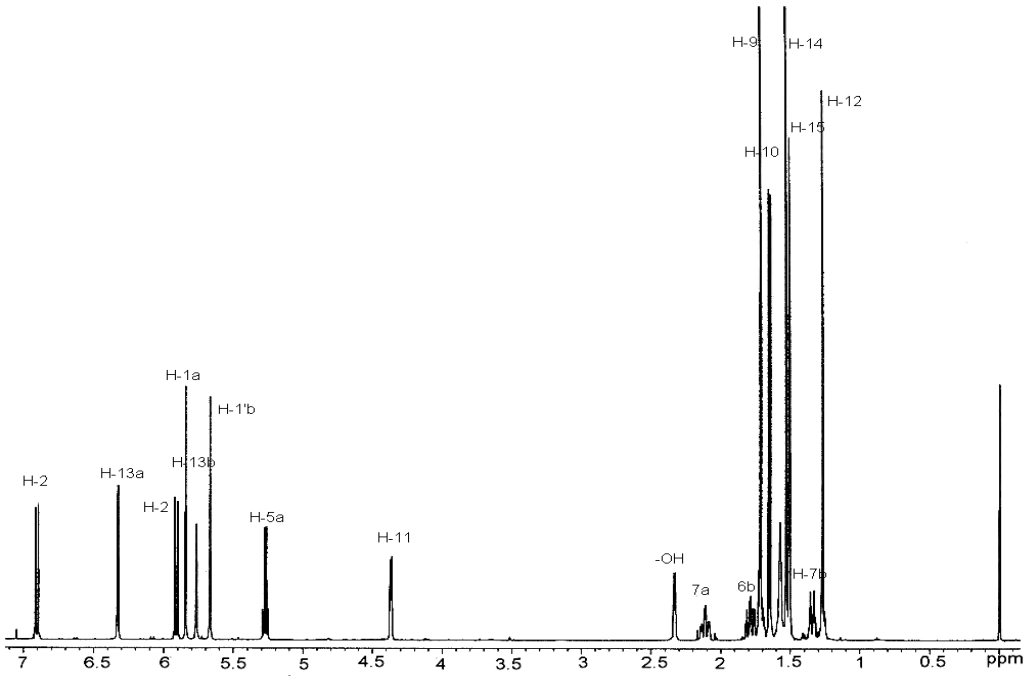


Figura 34. Espectro RMN^{1}H de dehidroaustinol.

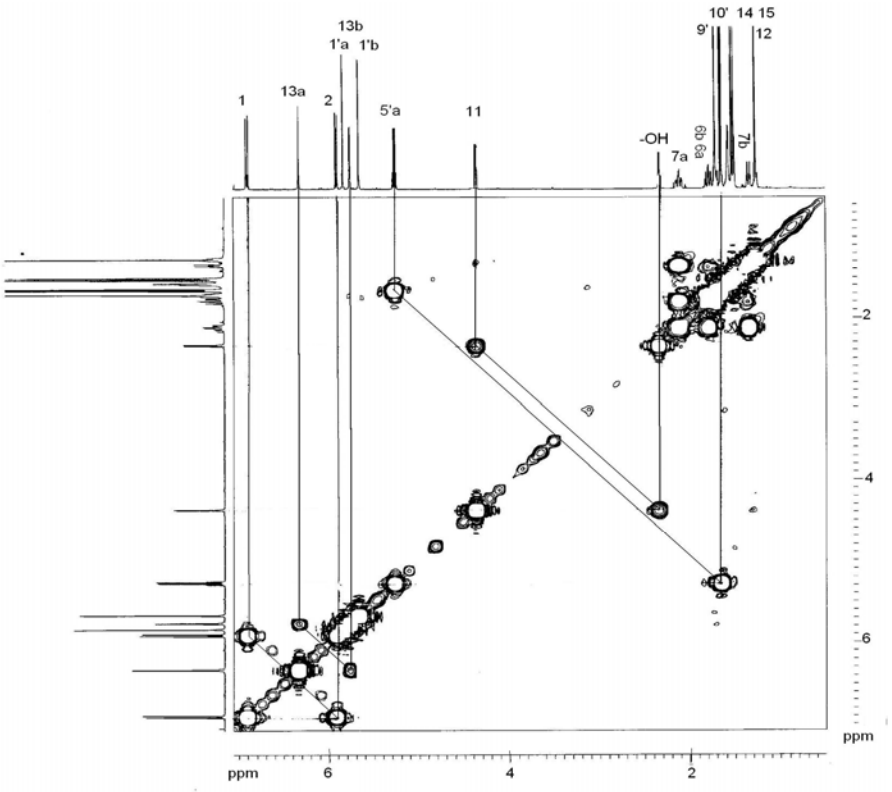


Figura 35. Experimento COSY de dehidroaustinol.

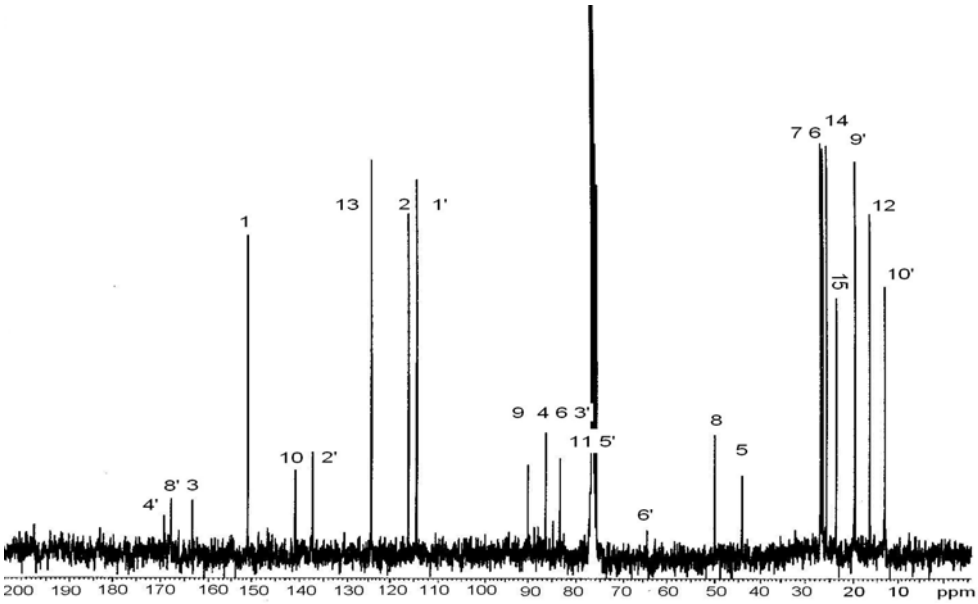


Figura 36. Espectro RMN^{13}C de dehydroaustinol

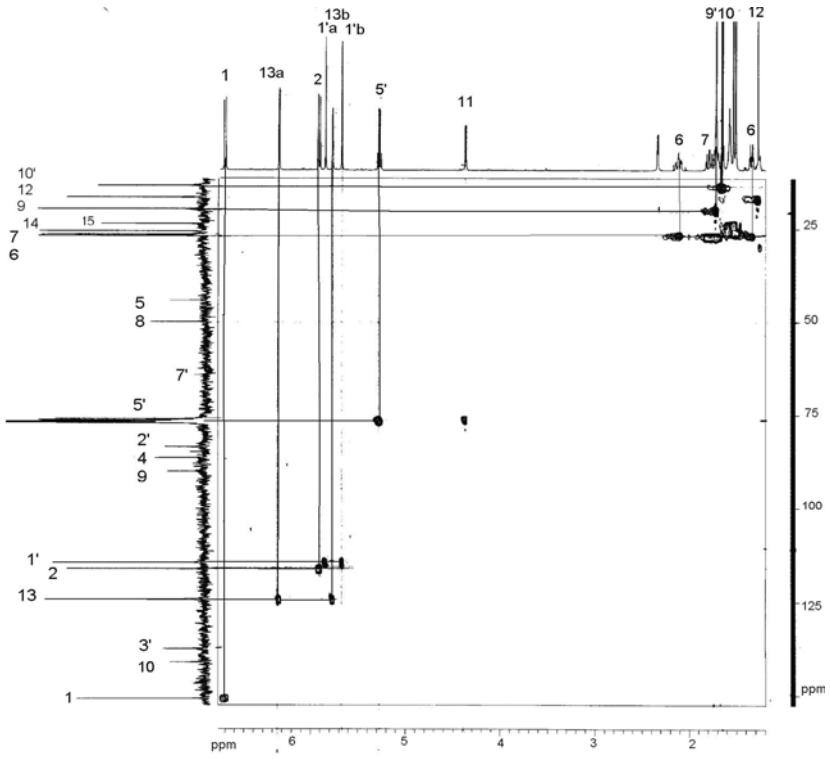


Figura 37. Experimento HMQC de dehidroaustinol

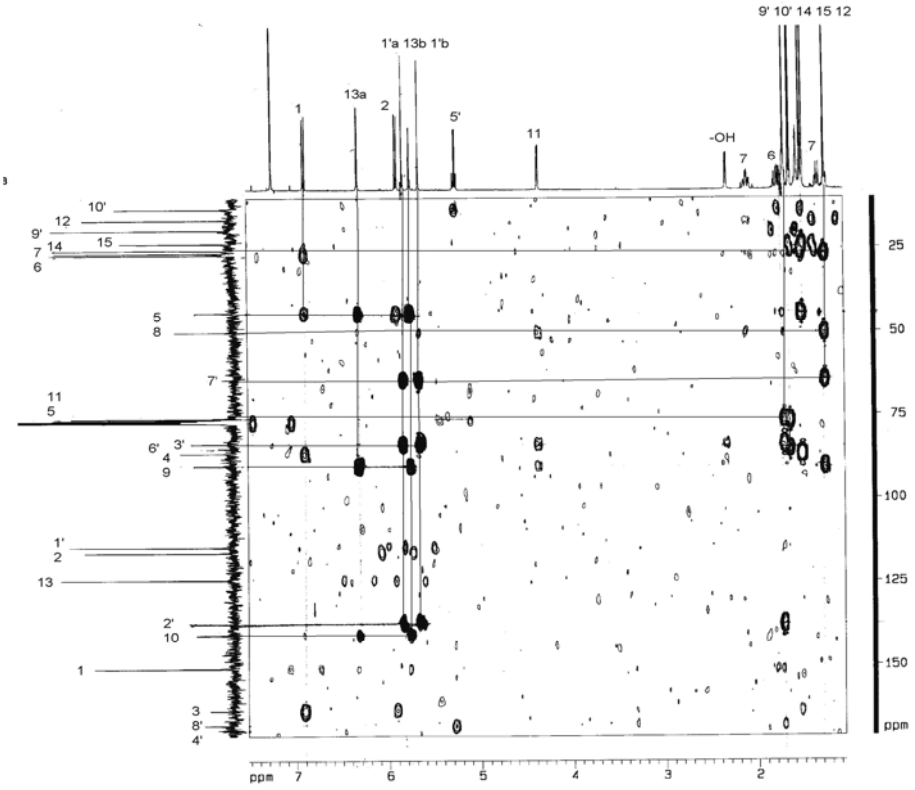


Figura 38. Experimento HMBC de dehydroaustinol

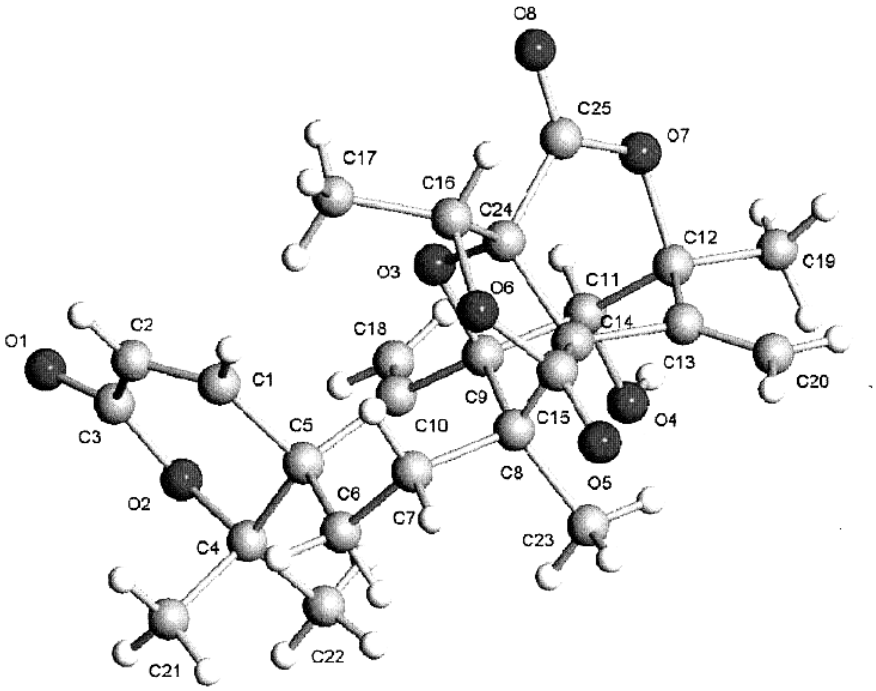


Figura 39. Estructura 3D obtenida por cristalografía del dehydroaustinol.

Tabla 10. Datos de la estructura cristalina del compuesto 5

Identification code	145XYZ04 (Solved by: R. A. Toscano)	
Project Title	**CLS12-5**	
Empirical formula	$C_{25}H_{28}O_8$	
Formula weight	456.47	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	$P\,2_1\,2_1\,2_1$	
Unit cell dimensions	a = 7.8580(8) Å	α= 90°
	b = 11.621(1) Å	β= 90°
	c = 24.102(2) Å	γ = 90°
Volume	2200.9(3) Å^3	
Z	4	
Density (calculated)	1.378 Mg/m^3	
Absorption coefficient	0.103 mm^{-1}	
F(000)	968	
Crystal size / colour / shape	0.356 x 0.082 x 0.042 mm / colorless / prism	
Theta range for data collection	1.69 to 25.05°	
Index ranges	-9<=h<=8, -13<=k<=13, -28<=l<=23	
Reflections collected	13231	
Independent reflections	3882 [R(int) = 0.0637]	
Completeness to theta = 25.05°	99.7 %	
Measurement device	Bruker Smart Apex CCD diffractometer	
Absorption correction	Analytical: face-indexed	
Max. and min. transmission	0.9955 and 0.9737	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	3882 / 0 / 306	
Goodness-of-fit on F^2	0.983	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0451, wR2 = 0.0498	
R indices (all data)	R1 = 0.0842, wR2 = 0.0560	
Absolute structure parameter	0.0(11)	
Largest diff. peak and hole	0.133 and -0.141 e.Å^{-3}	

Tabla 11. Datos espectroscópicos RMN ^{1}H y RMN ^{13}C de dehidroaustinol (en $CDCl_3$ a 500 MHz, δ en ppm)

C	δ	Multiplicidad *	Conectividad $^{1}H/^{13}C$**	Multiplicidad NMR ^{1}H ***	Acoplamiento $^{1}H/^{1}H$**	Correlación $^{13}C/^{1}H$ a 2, 3, 4 y 5 enlaces
1	150.9	CH	H-1 (δ,6.90)	d (10.2 Hz)	H-2	
2	116.2	CH	H-2 (δ,5.91)	d (10.2 Hz)	H-1	
3	163.5	C				H-1^{3}, H-2^{2}
4	86.4	C				H-1^{3}, H-14^{2}, H-15^{2}
5	44.3	C				H-^{12}, H-2^{3}, H-13^{3}, H-14^{3}
6	26.9	CH_2	H-6a (δ,1.72); H-6β (δ, 1.78)	m td (4.6, 13, 27.7 Hz)	H-6b, H-7 H-6a, H-7	H-1^{4}, H-12^{3}, H-14^{5}
7	26.5	CH_2	H-7a (δ, 2.1); H-7b (δ,1.34)	td (4.6, 13, 27.7 Hz) dt (3, 13 Hz)	H-7b, H-6 H-7a, H-6	
8	50.1	C				H-11^{3}, H-12^{2}
9	90.1	C				H-12^{3}, H-13a^{4}, H-13b^{4}
10	140.9	C				H-13a^{2}, H-13b^{2}
11	75.0	CH	H-11(δ, 4.37)	d (4.0 Hz)	-OH	H-9′^{3}
12	16.7	CH_3	H-12 (δ, 1.27)	s	H-6, H-7	H-6^{4}
13	124.3	CH_2	H-13a(δ, 6.33); H-13b (δ, 5.76)	s s		
14	25.7	CH_3	H-14 (δ, 1.53)	s	H-15	H-15^{3}
15	23.7	CH_3	H-15 (δ, 1.51)	s	H-14	H-14^{3}
1′	114.5	CH_2	H-1′a(δ, 5.84); H-1′b (δ, 5.67)	s s		
2′	137.4	C				H-1′a^{2}, H-1′b^{2}, H-9′^{3}
3′	83.5	C				H-1′a^{3}, H-1′b^{3}, H-9′^{5}
4′	169.0	C				H-5′^{3}
5′	76.1	CH	H-5′ (δ, 5.27)	q (6.8 Hz)	H-10′	H-10′^{2}
6′	84.9	C				H-10′^{3}
7′	64.0	C				H-1′a^{3}, H-1′b^{3}, H-12^{3}
8′	167.2	C				H-5′^{3}
9′	19.8	CH_3	H-9′ (δ, 1.71)	s		
10′	13.5	CH_3	H-10′ (δ, 1.65)	d (6.8 Hz)	H-5′	H-5′^{2}
OH			δ, 2.30	d (4.0Hz)	H-11	

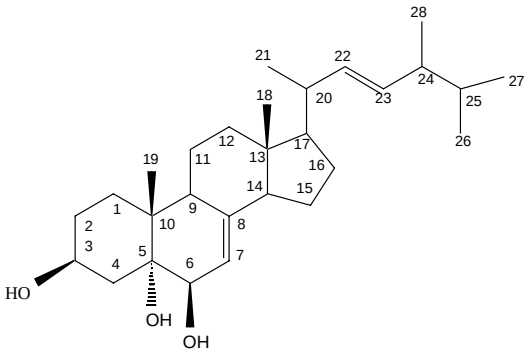
* La multiplicidad es a partir del DEPT ^{13}C.

** Las asignaciones fueron confirmadas por los experimentos ^{1}H COSY, DEPT, HSQC, HMQC y HMBC.

*** Multiplicidad a partir de experimento $^{1}HNMR$. Las constantes de acoplamiento de los protones en Hertz (*J*).

Compuesto 6

De las fracciones obtenidas con polaridad 1:1 (Hexano-Acetato de etilo), se obtuvo un sólido cristalino blanco, soluble en acetona y metanol. El cual fue identificado como 5α-ergosta-7,22-dien-3β, 5α, 6β-triol o cerevisterol *(6)* por medio del análisis espectroscópico de RMN ^{1}H, y por comparación con la literatura (Trigos *et al.*, 1997).



6

En el espectro de RMN^{1}H, a 500 Mhz, utilizando cloroformo deuterado como disolvente (figura 39), se lograron identificar la siguientes señales: una señal doble centrada en 5.35 ppm originada por el protón vinílico H-7, en 5.19 ppm una señal compleja que integra para los dos protones vinílicos de la cadena lateral H-22 y H-23; en 4.08 ppm una señal compleja ancha, que se asignó al protón H-3 geminal a un grupo hidroxilo en posición β. En 3.63 ppm una señal simple que integra para un protón, asignada a H-6 geminal a otro grupo hidroxilo.

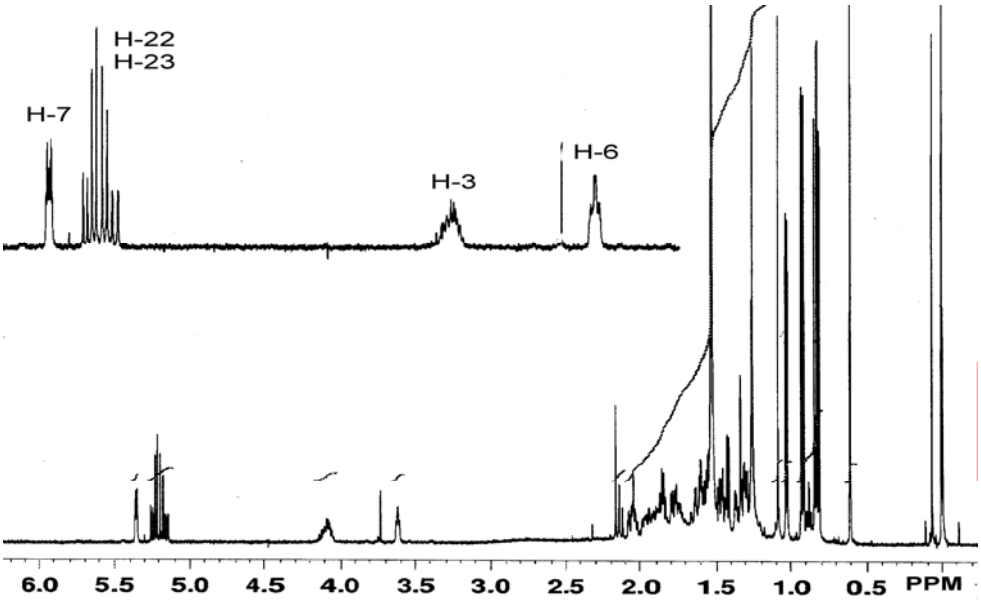


Figura 40. Espectro RMN^{1}H de cerevisterol

A campo alto (Figura 40) se distinguen dos señales simples en 1.08 y 0.60 ppm integran cada una para tres protones, originadas por los grupos metilo H-19 y H-18 respectivamente; en 1.03 y 0.92 ppm dos señales dobles que se asignaron a H-21 y H-28,

finalmente otras dos señales dobles parcialmente solapadas en 0.84 y 0.82 ppm que integran para tres protones cada una, generadas por los metilos H-27 y H-26.

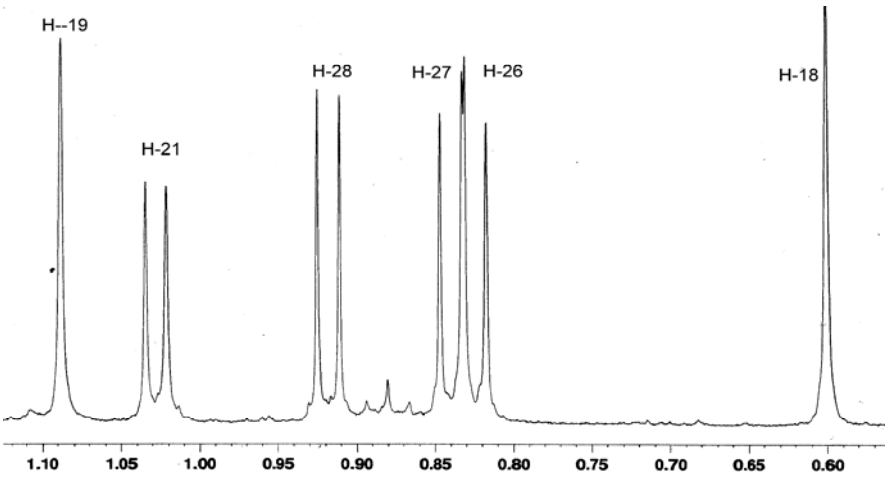


Figura 41. Ampliación a campo alto del espectro RMN^{1}H de cerevisterol

Finalmente, de la cromatografía exhaustiva en columna, del extracto metanólico de la biomasa de esta cepa, únicamente se logró aislar un sólido cristalino transparente, el cual resulto ser la mezcla de anómeros α y β de la glucopiranosa, la cual se identificó por sus características fisicoquímicas y espectroscópicas en RMN^{1}H al ser comparadas con una muestra auténtica y con la literatura (Manual Aldrich).

8.2 CEPA CLS2

5.5 g de extracto de acetato de etilo se sometieron a separación por cromatografía en columna, utilizando condiciones similares a las mencionadas para la cepa anterior.

De esta separación se lograron aislar de las fracciones con hexano-acetato de etilo 8:2, 52 mg de ergosterol, y de las fracciones obtenidas con hexano-acetato de etilo 3:7, 8 mg de cerevisterol los cuales se identificaron por sus propiedades fisicoquímicas y por comparación con muestras auténticas y por RMN^{1}H.

Del extracto metanólico de la biomasa de esta cepa se obtuvo por cromatografía en columna con cloroformo-metanol, únicamente una mezcla de α− y β−glucopiranosa, la cual, de igual forma, se identificó por sus características fisicoquímicas y espectroscópicas en RMN^{1}H al ser comparadas con la literatura (Manual Aldrich).

9. DISCUSIÓN

El cultivo en fermentación sólida, se seleccionó debido a los reportes existentes acerca de sus ventajas en la producción de metabolitos secundarios, sobre el crecimiento en medio líquido. Utilizando como soporte inerte espuma de poliuretano, evaluamos cuatro condiciones de nutrientes del medio mínimo, mediante curvas de crecimiento; con el fin de establecer el tiempo en el cual estas cepas inician su fase estacionaria, dado que se ha reportado que la formación de metabolitos secundarios comienza cuando ha terminado el crecimiento de la biomasa (Parés,1997). Este hecho está relacionado con la disminución de nutrientes y con otros tipos de estrés. Sin embargo, nosotros seleccionamos una concentración mayor de glucosa (50 g por litro) y una concentración normal (1X) de oligoelementos, para escalar el cultivo, ya que con esta concentración de glucosa se obtuvo un mejor rendimiento de extracto, y un mayor numero de componentes observados por CCD. Con las condiciones mencionadas, de aislaron e identificaron seis compuestos en la cepa "silvestre" CLS12, de los cuales emericelina, shamixantona, dehidroaustinol y peroxi-ergosterol, no se obtuvieron de la cepa CLS2, *cfwA2*, ni tampoco se lograron detectar por cromatografía en capa fina. Por lo tanto, se comprobó que estos compuestos son producidos por vías PKSs que dependen del producto del gen *cfwA2* o PPTasa.

El primer policétido estable en la vía de síntesis de ST, es una antraquinona, el ácido norsolorínico; el cual fue aislado de cepas con la mutación *ΔstcE,* la cual no produce la micotoxina ST, (Butchko *et al*., 1999). Sin embargo, en este estudio no se identificó dicho compuesto, a su vez se aislaron las xantonas, emericelina y shamixanthona, reportadas con anterioridad en *Emericella nidulans* (Ishida *et al*., 1975a), y *Aspergillus variecolor* (Chexal *et al*., 1975) respectivamente.

La shamixantona, es una xantona isoprenilada que biogenéticamente proviene de tres vías de síntesis de productos naturales: shikimato, policétido e isopreno (Schmidt, W. & Beerhues, L. 1997; Peres V y col., 2000). Se conoce que uno de los dos anillos aromáticos proviene de una molécula de hidroxibenzoato, la cual a su vez proviene de la ruta del shikimato. La vía del shikimato provee de unidades de síntesis para diversos metabolitos de plantas y hongos, teniendo como intermediario a la fenilalanina, tales como ligninas, estilbenos y flavonoides, en plantas. Por otro lado se ha reportado que las xantonas pueden provenir de la ruptura y re-arreglo de antronas (Bardshiri *et al*., 1984). Los

pigmentos miceliales como las xantonas y varios meroterpenoides, demuestran que las especies de *Aspergillus* pueden combinar precursores policetídicos y terpenoides para formar compuestos que presentan una oxidación extensiva. La incorporación de carbono marcado sugirió que un precursor octacétido se cicla para formar una antrona, la cual es hidroxilada y O-prenilada por el dimetil-alil-pirofosfato. Este ciclo finalmente se abre, para formar un derivado de benzofenona, o se oxida formando la antraquinona (Ahmed *et al*, 1992).

En el presente trabajo, no aislamos alguna antraquinona en la cepa silvestre (CLS12), posiblemente a que las condiciones de cultivo, con mayor cantidad de oxigeno disponible, propiciaron una ruta mas oxidativa, como la ruptura de esta para formar las xantonas. Por otro lado, la shamixantona no había sido aislada anteriormente en esta especie y se ha obtenido de especies marinas de *Aspergillus,* presentando propiedades antibióticas contra bacterias Gram (+) y Gram (-) (Malstrom *et al.,* 2002; Bringmann *et al*., 2003). La emericelina, fué aislada de cultivos de *A. nidulans* (Ishida y col *et al,* 1975a, b), es también una xantona isoprenilada, a diferencia de la shamixanthona, es que una de las cadenas de isoprenilo, no esta ciclada. La biosíntesis es similar a shamixanthona, dependiendo por tanto de una ruta mixta, que conlleva la activación por parte de CfwA/NpgA.

El dehydroaustinol, fue reportado en cultivos de *Emericella dentata*, este tipo de compuestos denominados meroterpenoides o triprenil-fenoles, se han aislado también de *Aspergillus variecolor, Aspergillus ustus*, de especies de *Penicillium* y de microorganismos de ambientes marinos; es biosintetizado por una vía mixta policétido-terpenoide. La biosíntesis de los meroterpenoides, en hongos comienza con la adición directa de pirofosfato de farnesilo (vía terpenoide), a una molécula de orselinato (Figura 42), el cual es aportado por una PKS. Se ha demostrado que la síntesis de austina (2) en *A. ustus*, comienza con la C-alquilación del tetracétido 3,5-dimetil-orselinato por pirofosfato de farnesilo, y seguido por una ciclación y una modificación oxidativa (Simpson *et al*., 1984 y 1997). La drástica modificación del resto orselinato fue documentada mediante incorporación de oxígeno marcado ($^{18}0_2$), proponiendo que los átomos de oxígeno unidos a C-3' y C-5' derivan de la atmósfera; y los átomos de oxígeno de los carbonilos C-4' y C-8' y del alcohol C-6' pueden derivar del policétido 3,5-dimetil-orselinato (1), (Scott *et al*.,1986).

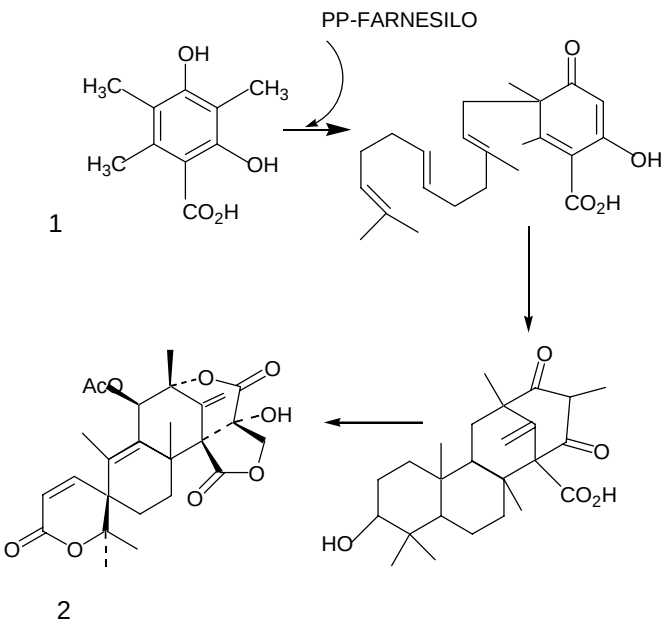


Figura 42. Vía de síntesis de la dehidroaustina, un meroterpenoide.

El ergosterol es un componente normal de las membranas de hongos, en la mutante CLS12 se aisló peroxido de ergosterol, el cual puede provenir de la adición del oxigeno singulete, en donde, el oxigeno proveniente de la atmósfera, es activado por un fotosensibilizador que puede ser un compuesto colorido (Ortega-Regules y A. Trigos). En esta cepa los pigmentos productos de las PKSs pudieron actuar como fotosensibilizadores para la formación del derivado oxidado del ergosterol, lo cual no sucedió en la mutante *cfwA2*, con las mismas condiciones de cultivo. Estos resultados, sugieren que la actividad de CfwA, es necesaria para producir un fotosensibilizador natural capaz de producir oxigeno singulete en *A. nidulans*. De manera similar, algunos hongos patógenos de plantas producen el policétido cercosporina, que actúa como fotosensibilizador para formar oxigeno singulete, el cual les confiere patogenicidad.

Por otro lado, se ha encontrado que el peroxido de ergosterol presente en diversos basidiomicetes, tiene propiedades antioxidantes en células de hígado de rata, además de que también ha demostrado tener propiedades citotóxicas en contra de varias líneas de células cancerígenas Kawagishi *et al*, 1998; Kim *et al*; 1999; Nam *et al*, 2001).

El cerevisterol ha sido reportado como un esteroide citotóxico, aislado de varias fuentes de hongos microscopios y de basidiomicetes, más recientemente, se encontró que inhibe la

actividad de la ADN polimerasa α, y que es el componente principal del hongo usado en la quimioterapia contra el cáncer, en la medicina tradicional china, conocido como hongo "*reishi*" o "*mannentake*" (*Ganoderma lucidum*, Mizushina *et al*., 1999).

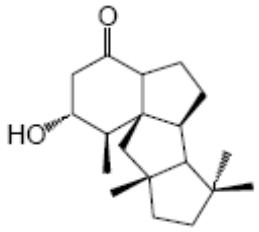
En la cepa CLS2, se obtuvieron únicamente ergosterol y cerevisterol, el primero en una concentración significativamente más alta que en la cepa silvestre, lo que nos indica que no hubo una extracción deficiente de los cultivos. Además el contenido de ácidos grasos es muy similar en ambas cepas lo que apoya lo anteriormente dicho. Asimismo el derivado oxidado del ergosterol, no se detectó en *cfwA2*, ya que no encontramos los pigmentos policetídicos los cuales pueden actuar como fotosensibilizadores.

El hallazgo en esta cepa de dos esteroles y no de las xantonas y el meroterpenoide, puede apoyar el hecho de que existe un déficit en la síntesis de derivados policétidos, lo que confirma la hipótesis propuesta. Por otro lado, experimentos anteriores demostraron que cepas silvestres contiguas de *A. nidulans*, son capaces de suprimir el déficit de pigmentación y esporulación en mutantes *cfwA2 (*Aguirre J., comunicación personal*)*. Debido a que esta cepa no produjo las dos xantonas y el dehydroaustinol, se intentó demostrar, si estos compuestos eran capaces de suprimir las deficiencias de conidiación de *cfwA2*. También se probaron los compuestos en mutantes afectadas en el desarrollo Δ*fluG*, *fluF (*Lee y Adams*, 1996)* y *NpgA* (Kim *et al*, 2001) debido a que estas mutaciones aparentemente presentan una deficiencia en la generación de señales internas de esporulación y de igual forma una deficiencia en esporulación y pigmentación de estas mutantes es revertida al ser co-inoculadas con colonias silvestres de *A. nidulans*.

Los resultados mostraron que shamixanthona, emericelina, dehydroaustinol y peroxi-ergosterol, no son capaces de revertir los defectos de la conidiación de mutantes *cfwA*, Δ*fluG*, *fluF* y *NpgA*, lo que nos puede indicar que otros compuestos que son dependientes de *cfwA,* están implicados en el inicio de la esporulación. Ya que en estudios previos, se observó que el extracto completo con acetato de etilo, de cultivos de la cepa silvestre CLS12 (o *cfwA*+), suprimen el defecto en la esporulación y en la pigmentación. Esto nos puede indicar que él o los compuestos responsables de esta señalización, y que son dependientes de una PPTasa pueden estar presentes en muy bajas cantidades en el extracto y que no se lograron aislar con la metodología experimental utilizada. La incapacidad de la mutante *cfwA2* para producir pigmentos y la micotoxina ST, nos sugirió

que la PPTasa CfwA era indispensable para la activación de las PKSs: WA y StcA, requerida para la producción de los metabolitos secundarios, asociados al desarrollo de esporas asexuales. Sin embargo, las mutantes sin la actividad de WA, o con el gen *brlA*, también son capaces de inducir el fenómeno de alimentación cruzada (figura 13). Estos resultados sugieren que la PPTasa CfwA, es necesaria para la producción de algún otro metabolito, independientemente de la actividad de WA o BrlA.

En un estudio reciente acerca de moléculas señalizadoras en *Penicillium cyclopium,* se demostró que el inicio de la conidiación está controlado por la acumulación de conidiogenona, el cual es un diterpeno sintetizado endógenamente por este hongo, con la función de informar a las hifas de su emergencia al aire y del inicio de la esporulación. En ese mismo trabajo, proponen que la inducción de la esporulación asexual en *Aspergillus nidulans,* está mediada por un metabolito terpenoide de características similares a la conidiogenona, aunque no demuestran su estructura química, por las mínimas cantidades presentes en las fracciones del extracto crudo (Cordobés-Martín, S., tesis doctoral 2005). Mencionan que podría estar relacionado estructuralmente con las austinas y el dehydroaustinol, no obstante, en este trabajo nosotros demostramos que este ultimo compuesto, no revierte el defecto de esporulación al ser probado en dos cepas "fluffy" y en *cfwA* o *npgA.*



Conidiogenona

10. CONCLUSIONES DE ESTE TRABAJO

La cepa silvestre de *Aspergillus nidulans* y la mutante *cfwA2*, producen ergosterol y cerevisterol, esteroles dependientes de la ruta metabólica del isopreno; sin embargo, la primera también es capaz de producir los policétidos shamixanthona, emericelina y dehidroaustinol, y el derivado peroxi- del ergosterol.

Por lo tanto:

1. El gen *cfwA2,* que codifica para una PPT-asa (CfwA-NpgA), es esencial para la síntesis de las xantonas y el dehydroaustinol, y para la activación de al menos dos PKS diferentes involucradas en la síntesis de estos metabolitos secundarios, en *Aspergillus nidulans*.

2. La síntesis del peróxido de ergosterol a través de la foto-oxidación con oxígeno singulete, en *A. nidulans* está relacionada con la presencia de los pigmentos sintetizados mediante las PKSs,que a su vez dependen de la actividad del gen *cfwA2.*

Los compuestos obtenidos en la cepa silvestre, y que dependen del gen *cfwA2*, no revierten el déficit de esporulación y pigmentación, en cepas algodonosas o en la cepa *cfwA2*.

Por lo que:

3. Al parecer *A. nidulans* es capaz de producir otros compuestos en concentraciones menores, que funcionan como señal de inicio de la esporulación, los cuales también dependen del gen *cfwA2*.

11. REFERENCIAS

Adams TH, Wieser JK y Yu JH (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 35-54.

Aguirre J (1992). *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia* 43:445-450

Aguirre J, Ortíz R, Clutterbuck J, Tapia R, Cárdenas M (1993). *vegA* and *cfwA* define two new developmental genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Newsl*. 40a:68.

Ahmed SA, Bardshiri E, McIntyre CR y Simpson TJ (1992). Biosynthetic studies on tajixanthone and shamixanthone, polyketide hemiterpenoid metabolites of *Aspergillus variecolor*. *Aust. J. Chem.* 45: 249-274.

Aidoo KE, Henry R y Word BJB (1982). Solid substrate fermentations. *Adv Appl Microbiol*. 28:201-237.

Auria R, Hernandez S, Raimbault M y Revah S (1990). Ion exchange resin: A model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Techniques* 4(6):391-396.

Bardshiri E, McIntyre CR, Simpson TJ, Moore RN, Trimble LA y Vederas JC (1984). Biosynthesis of tajixanthone and shamixanthone by *Aspergillus variecolo*r: incorporation of Oxygen-18 gas. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*. 21: 1404-1406.

Barrios-González J, Tomassini A, Viniegra-González G y López L (1988). Penicillin production by solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 10:793-798

Birse ChE y Clutterbuck J (1990). N-acetyl-6-hydroxytryptophan oxidase, a developmentally controlled phenol oxidase from *Aspergillus nidulans*. *Gen Microbiol*, 135, 1725-1730.

Bringmann G, Lang G, Setffens S, Günther E y Schaumann K (2003). Evariquinone, isoemericellin, and stromemycin form a sponge derived strain of the fungus *Aspergillus variecolo*r. *Phytochem*. 63:437-443.

Brown DW, Hauser FM, Tommasi R, Corlett S y Salvo JJ (1993). Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus. Tetrahedron Lett*.34(3):419-422.

Brown DW, Adams TH y Keller NP (1996a). *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14873-7.

Brown D W, Yu JH, Kelkar HS, Fernandes M, Nesbitt TC, Keller NP, Adams TH y Leonard TJ (1996b). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in Aspergillus nidulans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4):1418-22.

Bu'Lock JD (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Adv. Appl. Microbiol*. 3:292-342.

Butchko RAE, Adams TH y Keller NP (1999). Aspergillus nidulans mutants defective in *stc* gene cluster regulation. *Genetics*, 153:715-70.

Butnick NZ, Yager LN, Hermann TE, Berman Kurtz M y Champe SP (1984). Mutants of Aspergillus nidulans blocked at an early stage of sporulation secrete an unusual metabolite. *J Bacteriol* 160(2):533-540.

Calvo AM, Wilson RA, Woo Bok J y Keller NP (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal development. Microbiol. & Mol Biol Rev. 66(3):447-459.

Cárdenas M. Una nueva mutante de *Aspergillus nidulans* afectada diferencialmente en el crecimiento y la esporulación (1996). Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM.

Chexal KK, Holker JS y Simpson TJ (1975). The biosynthesis of fungal metabolites. Part VI. Structures and biosynthesis of some minor metabolites from variant strains of *Aspergillus variecolor*. *J Chem Soc [Perkin 1]*: 549-554.

Clutterbuck AJ (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans. Genetics* 63:317-327.

Clutterbuck AJ (1972). Absence of laccase form yellow-spored mutants of Asperillus nidulans. *J Gen Microbiol*. 70:423-435.

Cole RJ y Schwweikert MA (2003). Handbook of Secondary fungal Metabolites Vol. 1. Academic Press. San Diego, Cal.

Diaz-Godinez G, Soriano-Santos J, Augur C y Viniegra-González G (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus Níger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26: 271-275.

Demain AL y Fang A (1999). The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Adv Biochem Engineer Biotechnol* 69:1-39

Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Scazzocchio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D.Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M.Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman,D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P.Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani, and B. W. Birren. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438:1105–1115.

Geiger O y Lopez-Lara IM (2002). Rhizobial acyl carrier proteins and their roles in the formation of bacterial cell-surface components that are required for the development of nitrogen-fixing root nodules on legume hosts. *FEMS Microbiol Lett* 208(2):153-62.

Geris dos Santos RM y Rodrigues-Filho E (2003). Structures of meroterpenes produced by *Penicillium sp*, an endophytic fungus found associated with Melia azedarach. *J. Braz. Chem. Soc.* 14:722-727.

Guzman-de-Peña D, Aguirre J y Ruiz-Herrera J (1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(2):199-205.

Hansberg W y Aguirre J (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J Teoret Biol*. 142:201-221.

Hicks JK, Yu JH, Keller NP y Adams TH (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* 16: 4916-4923.

Hill TW y Käfer E (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newslett* 48: 20-21.

Ishida M, Hamasaki T, Hatsuda Y, Fukuyama K, Tsukihara T y Katsube Y (1975a). Emericellin, a new metabolite from *Aspergillus nidulans*. *Agr Biol Chem* 39:291-292.

Ishida M, Hamasaki T, Hatsuda Y, Fukuyama K, Tsukihara T y Katsube Y (1975b). The structure of two new metabolites, emerin and emericellin from *Aspergillus nidulans*. *Agr Biol Chem* 39: 2181-2184.

Kawagishi H, Katsumi R, Sazawa T, Mizuno T, Hagiwara T and Nakamura T. (1998) Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry* 27 (9):2777 – 2779.

Keating, TA y Walsh CT. (1999). Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 3(5):598-606.

Keszenman-Pereyra D, Lawrence S, Twfieg ME, Price J y Turner G. (2003). The *npgA/cfwA* gene encodes a putative 4'Phosphopantetheinyl transferase which is essential for penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 43:186-190.

Kim JM, Han DM, Chae KS y Jahng KY (2001). Isolation and characterization of the *npgA* gene involved in pigment formation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Newsl (supple.)* 48: 52.

Kim SW, Park SS, Min TJ y Yu KH (1999). Antioxidant activity of ergosterol peroxide (5,8-epidioxy-5α,8α-ergosta-6,22E-dien-3β-ol) in *Armillariella mellea*. *Bull Korean Chem Soc*. 20(7):819-823.

Lee BN y Adams TH (1994). The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* 8: 641-651.

Lonsane BK, Saucedo-Castañeda G, Raimbault M, Roussos S, Viniegra-González G, Ghildyal NP, Ramakrishna M y Krishnaiah MM (1992). Scale-up stategies for solid state fermentation systems. *Process Biochemistry* 27:259-273.

MacCabe AP, van Liemp H, Palissa H, Unkles SE, Riach MBR, Pfeifer E, von Doren H y Kinghorn JR (1991). δ–(L-α–Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*- Molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J Biol Chem*. 266:12646-12654.

Maebayashi Y, Okuyama E, Yamazaki M y Katsube Y (1982). Structure of ED-1 isolated from *Emericella dentata*. *Chem Pharm Bull* 30: 1911-1912.

Malsmstrom J, Christophersen C, Barrero AF, Oltra JE, Justicia J y Rosales A (2002). Bioactive metabolites from a Marine-derived strain of the fungus *Emericella variecolor. J Nat Prod*,65:364-367.

Mapleston RA, Stone MJ y Williams DH (1992). The evolutionary role of secondary metabolites. *Gene* 115:151-157.

Márquez-Fernández O, Trigos A, Ramos-Balderas JL, Viniegra-Gonzáles G, Deising HB y Aguirre J (2007). Phosphopantetheinyl transferase Cfwa/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development.. *Eukaryotic Cell*. 6(4): 710-720.

Mayorga ME y Timberlake WE (1992). The developmentally regulated Aspergillus nidulans *wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol Gen Genet* 235(2-3):205-12.

McDaniel R, Ebert-Khosla S, Fu H, Hopwood DA y Khosla CH. (1994) Engineered Biosíntesis of novel polyketides: Influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. Prc Natl Acad. Sci USA. 91: 11542-11546.

Mitchell DA, Doelle HW y Greenfield PF (1988). Improvement of growth of *Rhizopus oligosporus* on a model solid substrate. *Biotechnol Lett* 18:497-501

Mizushina Y, Takahashi N, Hanashima L, Koshino H, Esumi Y, Uzawa J, Sugawara F y Sakaguchi K (1999). Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*. *Bioorg Med Chem* 7:2047–2052.

Mootz HD, Schorgendorfer K y Marahiel MA (2002). Functional characterization of 4'-phosphopantetheinyl transferase genes of bacterial and fungal origin by complementation of *Saccharomyces cerevisiae lys5*. *FEMS Microbiol Lett* 213: 51-57.

Nam KS, Jo YS, Kim YH, Hyun JW y Kim HW (2001). Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes. Life Sciences* 69:229-237.

Oberegger H, Eisendle M, Schrettl M, Graessle S y Haas H (2003). 4'-phosphopantetheinyl transferase-encoding *npgA* is essential for siderophore biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 44: 211-215.

Reuter K, Mofid MR, Marahiel MA y Ficner R (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J* 18(23):6823-6831.

Robinson T, Singh R y Nigam P (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology Biotechnology*. 55: 284-289.

Romero GS. (2001). Producción de invertasa por *Aspergillus nidulans* en fermentación líquida y fermentación sólida. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

Scott FE, Simpson TJ, Trimble LA y Vederas JC (1986). Biosynthesis of meroterpenoid austin by *Aspergillus ustus*: synthesis and incorporation of ^{13}C, ^{18}O-labelled ethyl 3,5 dimethylorsellinate. *J. Chem. Soc., Chem. Commun*.: 214-215.

Sekiguchi J y Gaucher GM (1977). Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. *Appl. Environ. Microbiol*. 33:147-158.

Sewall T, Mims CW y Timberlake WE (1990) abaA controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell* 2:731-739

Shimizu K y Kelller NP (2001). Genetic involvement of cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans. Genetics*. 157:591-600.

Simpson TJ, Ahmed SA, McIntyre CR, Scott FE y Sadler IH (1997). Biosynthesis of polyketide-terpenoid (meroterpenoid) metabolites andibenin B and Andilesin A in *Aspergillus variecolor*. *Tetrahedron* 53.

Soid-Raggi G, Sánchez O y Aguirre J (2006). TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 59:854-869.

Tag A, Hicks J, Garifullina G, Ake CJ, Phillips TD, Beremand M y Keller N (2000) G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. Mol Microbiol 38:658-665.

Timberlake WE y Clutterbuck AJ (1994). Genetic regulation of conidiation. In *Aspergillus: 50 years on.* Vol. 29. Martinelli, S.D.and Kinghorn, J.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 383-427.

Trigos A, Amezcua C, Reyna S y Carrión G (1997). Cerevisterol from cultures of *Verticilium lecanii*. *Micol. Neotrop. Apl*. 10:57-62.

Trigos A y Ortega-Regules A (2002) Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia* 94: 563-568.

Turner WB y Aldridge PC(1983). Fungal Metabolites part II. Academic Press, London.

Viniegra-González G, Aguilar CN, Díaz G, Romero S, Favela E, Loera O, Soriana J y Augur C (2002). Producción de enzimas por *Aspergillus níger* cultivado sobre soportes sólidos. NANACATEPEC. Estudios sobre los Hongos Latinoamericanos. IV Congreso Latinoamericano de Micología. México, DF p. 123.

Walsh CT, Gehring AM, Weinreb PH, Quadri LE y Flugel RS (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* 1(3):309-315.

Watanabe A y Ebizuka Y (2002). A novel hexaketide naphthalene synthetized by a chimeric polyketide synthase composed of fungal pentaketide and heptaketide synthases. *Tetrahed Lett*. 43:843-846.

Watanabe A, Fujii I, Sankawa U, Mayorga ME, Timberlake WE y Ebizuka Y. (1999) Re-identification of *Aspergillus nidulans wA* gene to code for a poliketide sintase of naphthopyrone. *Tetrahedron Lett* 40. 91-94.

Wieser J y Adams TH (1995). *flbD* encodes a Myb-like DNA binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* 9: 491-502.

Zhu Y, Smits JP, Knol W y Bot J (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnol Lett* 16(6): 643-648.