



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS



Análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja

Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Torres Martínez José Juan

Director de tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP-Sistema de Bibliotecas
Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Análisis transcrito asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja © 2026 por Torres Martínez José Juan se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en Laboratorio de Biotecnología de Células Vegetales y Bioinformática, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre agosto 2020 y agosto 2024, bajo la dirección de la Dra. Ruth Elena Soria Guerra y fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONAHCYT, registro 00590 .

Número de la beca otorgada por CONAHCYT: **CB2017-2018 A1-S8367**

Número de CVU: **511415**

Los datos del trabajo titulado "Análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja" se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



Universidad Autónoma
de San Luis Potosí

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS
Tel: 444-826-2300 ext. 6542 y 6540

San Luis Potosí, S.L.P. a 02 diciembre de 2020

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Profesor Investigador
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Presente

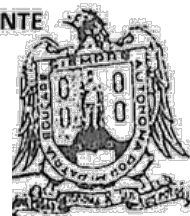
Estimada Dra. Ruth Elena Soria.

Habiendo revisado su solicitud para el registro de título de tesis del estudiante de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos José Juan Torres Martínez, esta Coordinación a mi cargo le informa que el Comité Académico del Posgrado avaló y consideró APROBADO el título de tesis:

"Análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul"

El protocolo de este registro de tesis NO requiere ser avalado por el Comité Ética en Investigación y Docencia (CEID). Sin otro en particular, me es grato saludarla.

ATENTAMENTE



POSGRADO EN CIENCIAS
EN BIOPROCESOS

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
FCQ, UASLP.
Tel 444-826-2300, Ext. 6542



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**
Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria - CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372
www.uaslp.mx

c.c.p. Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja

Tesis que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Torres Martínez José Juan

SINODALES:

Presidenta:

Dra. Catalina Arenas Huertero

Secretaria:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez

Vocal:

Dr. María Jazmín Abraham Juárez

Vocal:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Vocal:

Dr. Mishael Sánchez Pérez

Vocal:

Dra. Luzmila Martínez Gozález

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Director de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler: Sinodal de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Catalina Arenas Huertero: Sinodal de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. María Jazmín Abraham Juárez: Sinodal de tesis. Adscrita al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Mishael Sánchez Pérez: Sinodal de tesis. Asociado al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Luzmila Martínez González: Sinodal de tesis. Asociada al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a marzo / 10 / 2026

En la ciudad de *San Luis Potosí* el día *10* del mes de *marzo* del año *2026*. El que suscribe *José Juan Torres Martínez*, alumno del programa de posgrado *Doctorado en Ciencias en Bioprocesos* adscrito a *Facultad de Ciencias Químicas* manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: *Ruth Elena Soria Guerra* y cede los derechos del trabajo titulado “análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección ruth.soria@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

José Juan Torres Martínez

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 03/ 12 /2026

L.B. Reyna Nayeli Ortiz Quintero

Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Análisis transcriptómico asociado a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* por efecto de la luz azul y roja presentada por el autor José Juan Torres Martínez. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 18% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dra. Alicia Grajales Lagunes
Coordinadora Académica del Posgrado
en Ciencias en Bioprocesos

Dedicatoria

Cuenta la leyenda que un explorador partió de su hogar, un vasto y resiliente desierto en Torreón, con la misión de encontrar una montaña desconocida en las tierras altas de San Luis Potosí. El viaje sería largo y solitario.

Sus padres no pudieron acompañarlo en la travesía, pero le entregaron dos regalos antes de partir: una brújula (su educación) y un eco (su apoyo incondicional).

Durante la escalada, en las noches más frías y en los días de tormenta, cuando la cima del doctorado parecía inalcanzable, el explorador se detenía. Entonces, usaba la brújula para recordar el norte y escuchaba con atención...

Desde la lejanía del desierto, siempre llegaba el eco de dos voces que le decían:

"Sigue adelante"

Esos dos ecos, esos dos faros en la aparente sequedad del desierto, fueron la luz y el aliento que mantuvieron al explorador en el camino.

A mis padres:

Gracias por ser los faros de mi desierto. Esta cumbre es tan suya como mía.



Agradecimientos

El explorador llegó solo al pie de la gran montaña; una tierra extraña, llena de promesas, pero imponente y solitaria. No conocía a nadie.

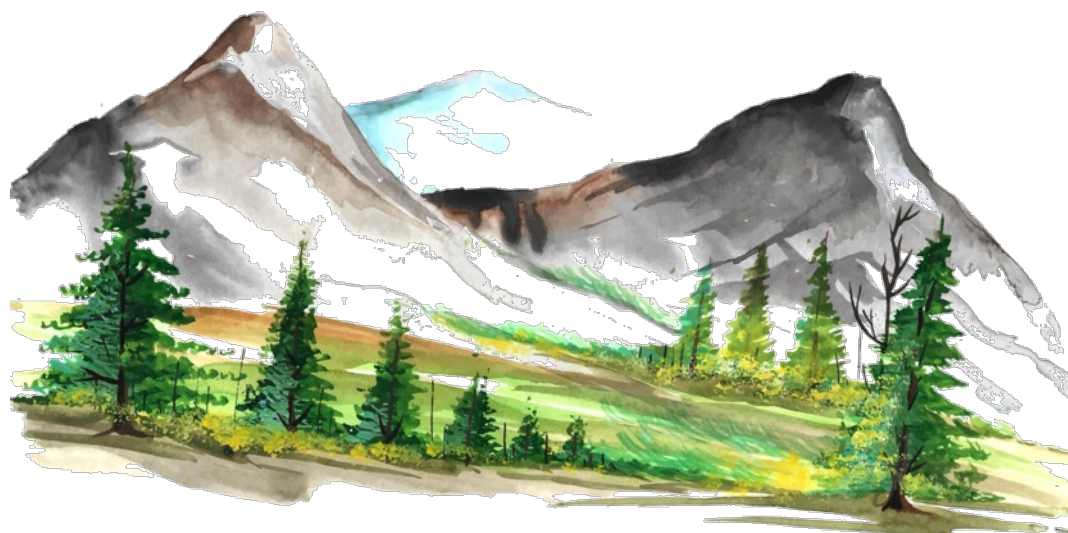
El primer desafío no fue escalar, sino encontrar la senda. La montaña no revela sus caminos a cualquiera. Fue entonces cuando conoció a la Guardiana de la cumbre. Ella, una maestra en los secretos de aquella montaña, vio el mapa que el explorador traía y el fuego de su determinación. Decidió confiar en él. Le entregó la llave de un observatorio secreto (su laboratorio), un lugar de trabajo y descubrimiento desde donde podría trazar su ruta. Sin esa llave, sin esa puerta abierta, el explorador se habría quedado en el valle, y nada de lo que vino después habría sido posible.

Una vez dentro, comenzó el verdadero ascenso. Y en esos primeros senderos escarpados, descubrió que no estaba solo. Encontró a otros viajeros. Al principio eran extraños, pero las largas noches de trabajo, el frío y los retos compartidos los unieron. Juntos, encendieron una fogata que nunca se apagó. Se convirtieron en la Comunidad del matraz. No compartían sangre, pero forjaron algo igual de fuerte: una familia elegida en la altitud, un campamento base de lealtad absoluta donde el explorador siempre encontró apoyo, consejo y un lugar al cual pertenecer.

Pero mientras escalaba, el explorador nunca olvidó el desierto.

Desde la lejanía, los centinelas de arena, sus hermanos de origen, vigilaban su avance. Aunque separados por la distancia, sus voces viajaban por el viento, fuertes como un juramento, recordándole que su antigua hermandad era un pilar que la geografía no podía romper.

Y junto a ellos, siempre presentes, estaban las voces de la torre, aquellas que compartían la misma luz que los faros. Ellas, sus hermanas y familia, se aseguraban de que el ánimo del explorador nunca flaqueara, enviando ecos de hogar que lo reconfortaban en los momentos de duda.



A mi mentora:

Gracias, Dra. Ruth, por ser la Guardiana que me entregó la llave. Sin usted, esta expedición no habría comenzado.

A mis amigos en San Luis Potosí:

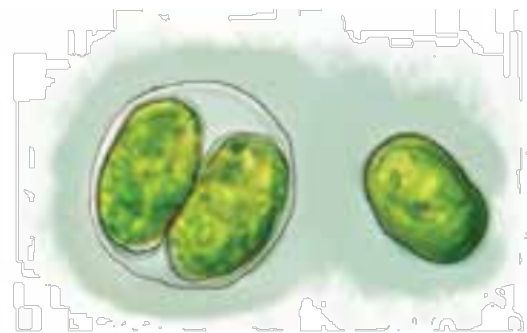
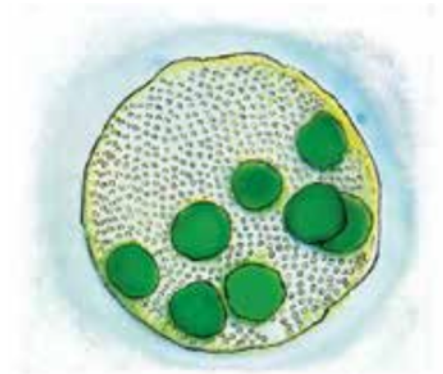
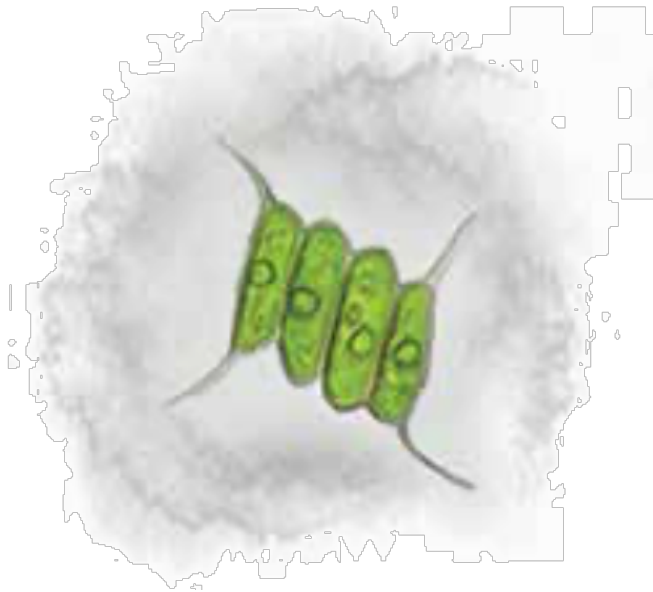
Ustedes fueron la Comunidad del matraz. Gracias por adoptar a un viajero solitario y convertir la montaña en un hogar.

A mis amigos de otras partes del planeta y a mis hermanas:

Ustedes fueron los Centinelas y las Voces que me sostuvieron desde el desierto.

Su apoyo incondicional demostró que...

Ningún explorado está verdaderamente solo. El camino así es.



Resumen

El uso de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles representa una alternativa sostenible frente a los combustibles fósiles. La manipulación de las condiciones de cultivo, como la calidad de la luz, puede optimizar la acumulación de lípidos, pero los mecanismos moleculares subyacentes no se comprenden completamente. Este estudio tuvo como objetivo analizar el transcriptoma de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en respuesta a la fotoestimulación con luz LED azul (400-500 nm) y roja (650-700 nm), en comparación con luz blanca de amplio espectro, para identificar las rutas metabólicas asociadas a la producción de lípidos. Se evaluaron parámetros cinéticos, contenido de clorofila, lípidos neutros y totales, y perfil de ácidos grasos. Posteriormente, se realizó un análisis de secuenciación de ARN (RNA-Seq) para obtener los perfiles de expresión génica diferencial. Los resultados mostraron que, aunque la biomasa final no varía significativamente, la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{Max}) fue mayor bajo luz azul. Contrario a lo esperado, el contenido de lípidos no aumentó bajo luz azul en las condiciones estudiadas. Sin embargo, el análisis transcriptómico reveló una reprogramación masiva del metabolismo celular. La luz azul indujo la sobreexpresión de genes clave en la biosíntesis de lípidos como KAS y BCR en *C. vulgaris* en el día 12, coincidiendo con la transición a la fase estacionaria. En *S. acutus*, la luz azul y roja aumentaron la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, lo que se correlacionó con la sobreexpresión del gen de la desaturasa. El análisis funcional del transcriptoma mostró un enriquecimiento significativo en categorías de transcripción y traducción, sugiriendo que la luz actúa como una señal regulatoria maestra que reconfigura la maquinaria informacional de la célula, preparándola para un nuevo estado metabólico. Se concluye que la luz azul modula la respuesta lipogénica de manera dependiente del estado fisiológico del cultivo, actuando como un potenciador de la respuesta al estrés nutricional más que como un inductor directo.

Palabras clave: microalgas, lípidos, transcriptómica, RNA-Seq, luz LED, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*

Abstract

The use of microalgae as a feedstock for biofuel production represents a sustainable alternative to fossil fuels. Manipulating cultivation conditions, such as light quality, can optimize lipid accumulation, but the underlying molecular mechanisms are not fully understood. This study aimed to analyze the transcriptome of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* in response to photostimulation with blue (400-500 nm) and red (650-700 nm) LED light, compared to broad-spectrum white light, to identify metabolic pathways associated with lipid production. Kinetic parameters, chlorophyll content, neutral and total lipids, and fatty acid profiles were evaluated. Subsequently, RNA sequencing (RNA-Seq) analysis was performed to obtain differential gene expression profiles. Physiological results showed that although final biomass did not vary significantly, the maximum specific growth rate (μ_{Max}) was higher under blue light. Contrary to expectations, lipid content did not increase under blue light in the studied conditions. However, the transcriptomic analysis revealed a massive reprogramming of cellular metabolism. Blue light induced the overexpression of key lipid biosynthesis genes such as KAS and BCR in *C. vulgaris* on day 12, coinciding with the transition to the stationary phase. In *S. acutus*, blue and red light increased the proportion of polyunsaturated fatty acids, which correlated with the overexpression of the desaturase gene. Functional analysis of the transcriptome showed significant enrichment in transcription and translation categories, suggesting that light acts as a master regulatory signal that reconfigures the cell's informational machinery, preparing it for a new metabolic state. It is concluded that blue light modulates the lipogenic response in a manner dependent on the physiological state of the culture, acting as an enhancer of the nutritional stress response rather than a direct inducer.

Keywords: microalgae, lipids, transcriptomics, RNA-Seq, LED light, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acutus*.

Contenido

Resumen.....	XI
Abstract.....	XII
Contenido.....	XIII
Indice de figuras.....	XVI
Indice de Tablas.....	XVIII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Potencial biotecnológico de las microalgas.....	2
2.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	3
2.3. <i>Scenedesmus acutus</i>	4
2.4. Eficiencia fotosintética en cultivos de microalgas.....	4
2.5. Biosíntesis de lípidos en microalgas.....	5
2.6. Tecnologías de fotoestimulación en cultivos de microalgas con luz LED.....	6
3. Justificación.....	8
4. Hipótesis.....	9
5. Objetivos.....	10
6. Materiales y métodos.....	11
6.1. Construcción de cámara de crecimiento.....	11
6.2. Propagación de las cepas de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	13
6.3. Parámetros cinéticos de las cepas de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	16
6.4. Extracción y cuantificación de clorofila.....	17
6.5. Extracción y cuantificación de lípidos neutros.....	18
6.6. Extracción de lípidos totales por radiación infrarroja (IR).....	19
6.7. Obtención y análisis de ADNc.....	21
6.8. Evaluación de genes implicados en la síntesis de lípidos.....	22
6.9. Evaluación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.....	23
6.10. Identificación y cuantificación de ácidos grasos.....	23
6.11. Número de cetano.....	24
6.12. Análisis transcriptómico.....	27
6.12.1. Análisis de calidad y filtrado de lecturas.....	27
6.12.2. Ensamblado <i>de novo</i> del transcriptoma.....	27
6.12.3. Anotación funcional de genes a partir del ensamblado <i>de novo</i>	28

6.12.4. Análisis de los Genes Diferencialmente Expresados (DEGs) utilizando categorías tipo Clústeres de grupos ortólogos (COG)	29
6.12.5. Análisis funcional con KEGG	29
6.13. Validación de los resultados del RNA-Seq mediante RT-qPCR	30
7. Resultados	32
7.1. Propagación de las cepas de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	32
7.2. Parámetros cinéticos de las cepas de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	34
7.3. Extracción y cuantificación de clorofila	36
7.4. Extracción y cuantificación de lípidos neutros	37
7.5. Extracción de lípidos totales por radiación infrarroja	39
7.6. Selección y validación de oligonucleótidos para análisis de expresión génica.	40
7.7. Obtención y análisis de ADNc	41
7.8. Evaluación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.....	46
7.9. Identificación y cuantificación de ácidos grasos.	49
7.10. Estimación del número de cetano.....	54
7.11. Análisis bioinformáticos	55
7.11.1. Control de calidad y estabilización de la varianza de los datos de expresión transcriptómica	55
7.11.2. Evaluación de la influencia de muestras en el modelo mediante distancias de Cook	57
7.11.3. Análisis de similitud global entre muestras mediante heatmap de distancias	59
7.11.4. Análisis de correlación entre muestras mediante heatmap de coeficientes de correlación.....	62
7.11.5. Visualización de la estructura global de los datos mediante análisis de componentes principales (PCA).....	64
7.12. Identificación de genes diferencialmente expresados en respuesta a diferentes longitudes de onda	65
7.12.1. Análisis global y gráficos de volcán	66
7.13. Análisis de enriquecimiento funcional de gene ontology (GO)	70
7.13.1. Procesos biológicos (Biological Processes - BP).....	70
7.13.2. Funciones moleculares (Molecular Functions - MF)	71
7.13.3. Visión integrada de la respuesta a la luz LED	73

7.14.	Análisis comparativo de la respuesta funcional a la luz azul y roja mediante categorías de genes ortólogos (COG)	74
7.15.	Mapeo funcional de rutas metabólicas mediante la base de datos KEGG	76
7.15.1.	Modulación de rutas metabólicas de interés bioenergético en <i>Scenedesmus acutus</i>	77
7.15.2.	Reconfiguración del metabolismo lipídico en <i>Chlorella vulgaris</i>	82
7.15.3.	Síntesis comparativa y estrategias regulatorias especie	84
7.16.	Validación de los resultados del RNA-Seq mediante RT-qPCR	86
8.	Discusiones	93
9.	Conclusiones	98
10.	Bibliografía	100

Índice de figuras

Figura 1.- Esquema de la cámara de crecimiento.	11
Figura 2.- Esquema de intensidad lumínica en Lux (lumen /m ²) dentro de la cámara de crecimiento.....	12
Figura 3.- Cámaras de incubación con luz LED roja y azul abiertas.	13
Figura 4.- Transferencia pre-inóculo a reactores de 250mL.....	15
Figura 5.- Interior de las cámaras de cultivo..	15
Figura 6.- Luz auxiliar en el cuarto oscuro.....	16
Figura 7.- Sistema de extracción de lípidos totales con radiación infrarroja.....	20
Figura 8.- Cinética de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	33
Figura 9.- Modelo cinético de Gompertz en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	35
Figura 10.- Concentración de clorofila total en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	36
Figura 11.- Concentración de lípidos neutros en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	38
Figura 12.- Porcentaje de lípidos totales en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	39
Figura 13.- ARN de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	43
Figura 14.- ARN de los días 7, 12 y 15 en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	44
Figura 15.- PCR de ARN de <i>C.a vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	45
Figura 16.- PCR con ADNc de <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	46
Figura 17.- Expresión relativa de genes en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	48
Figura 18.- Perfil de ácidos grasos en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	50
Figura 19.- Perfil de ácidos grasos saturados e insaturados en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	51
Figura 20.- Perfil de ácidos grasos insaturados en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	53
Figura 21.- Relación media-varianza después de la transformación estabilizadora de varianza (rlog).	57
Figura 22.- Distribución de las distancias de Cook	58
Figura 23.- Heatmap de distancias entre muestras (transformación VST)..	60
Figura 24.- Heatmap de coeficientes de correlación de Pearson entre muestras (transformación rlog).....	62
Figura 25.- Análisis de Componentes Principales (PCA).....	64

Figura 26.- Volcano plot del análisis de expresión diferencial para la comparación control (luz blanca) vs luz azul.....	66
Figura 27.- Volcano plot del análisis de expresión diferencial para la comparación control (luz blanca) vs luz roja.	67
Figura 28.- Volcano plot del análisis de expresión diferencial para la comparación directa luz azul vs luz roja.....	67
Figura 29.- Conteos normalizados (transformación VST de DESeq2)	69
Figura 30.- Análisis de enriquecimiento funcional de Gene Ontology (GO)	71
Figura 31.- Análisis de enriquecimiento funcional de funciones moleculares (MF) de Gene Ontology (GO).....	72
Figura 32.- Visión general del análisis de enriquecimiento funcional GO.....	73
Figura 33.- Análisis comparativo de la asignación funcional de genes diferencialmente expresados en categorías COG (Clusters of Orthologous Groups).....	75
Figura 34.- Ruta de fijación de carbono en <i>S. acutus</i>	78
Figura 35.- Ruta de glucólisis / gluconeogénesis en <i>S. acutus</i>	79
Figura 36.- Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en <i>S. acutus</i>	80
Figura 37.- Ruta del metabolismo de glicerolípidos en <i>S. acutus</i>	81
Figura 38.- Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en <i>C. vulgaris</i>	83
Figura 39.- Ruta del Metabolismo de glicerolípidos en <i>C. vulgaris</i>	84
Figura 40.- Expresión relativa de genes clave en <i>C.</i> validada por RT-qPCR.	90
Figura 41.- Expresión relativa de genes clave en <i>S. acutus</i> validada por RT-qPCR.	91
Figura 42.- Modelo comparativo de la ruta de biosíntesis de lípidos y puntos de regulación en <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	92

Índice de Tablas

Tabla 1.- Contenido de lípidos y productividad de biomasa en diferentes microalgas.....	3
Tabla 2.- Cuantificación de Lux y equivalente en $\mu\text{mol/s/m}^2$ para los paneles LED.	12
Tabla 3.- Oligonucleótidos diseñados para <i>C. vulgaris</i> y <i>S. acutus</i>	40
Tabla 4.- Cumplimiento normativo del número de cetano.....	54
Tabla 5.- Resumen de enzimas clave en <i>S. acutus</i> y <i>C. vulgaris</i>	85
Tabla 6.- Genes clave identificados por análisis funcional (GO/KEGG) para validación por RT-qPCR	87
Tabla 7.- Oligonucleótidos diseñados para la validación por RT-qPCR en <i>S. acutus</i>	88
Tabla 8.- Oligonucleótidos diseñados para la validación por RT-qPCR en <i>C. vulgaris</i>	89

1. Introducción

En la actualidad los insumos energéticos de amplia demanda suelen producirse dejando secuelas ecológicas derivado de su obtención; la explosión demográfica impacta en el aumento de su producción por la alta demanda que estos representan, por lo que se prevé que en los próximos años la tendencia de consumo aumente (Hu et al., 2020). La crisis del petróleo en los años 70 despertó un gran interés en la búsqueda de nuevas opciones energéticas renovables, principalmente biocombustibles como fuentes alternas directas de los derivados del petróleo (Timilsina & Shrestha, 2011), el cual representa el 73% de la producción de dióxido de carbono, uno de los principales gases asociados al cambio climático (Balat, Balat, & Öz, 2008). Una alternativa a la actual crisis energética es el uso de biocombustibles, definidos como combustibles potencialmente renovables, líquidos o gaseosos, que pueden utilizarse para la generación de electricidad, calor y energéticos.

Entre las opciones con más futuro se encuentra el empleo de microalgas como fuente de energía. Se ha demostrado que la biomasa de estos microorganismos es un potencial energético debido a sus diferentes productos, los cuales pueden ser el metano producido por la digestión anaerobia de la biomasa, biodiesel derivado del aceite microalgal, biohidrógeno producido fotobiológicamente, bioetanol producido por la fermentación de los azúcares y la biomasa de las microalgas (Ganesan et al., 2020), además de la obtención de productos de valor comercial como carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, ficobiliproteínas, compuestos bioactivos para la industria de los alimentos, farmacéutico, cosmético e industrial (Valverde, Romero-Campero, León, Guerrero, & Serrano, 2016).

La incursión en los estudios genéticos y metabólicos de última generación permite dirigir la producción de biomoléculas de interés con la modificación de rutas metabólicas conocidas, pero también trazar otras nuevas según la expresión de transcritos derivados de la activación de rutas no estudiadas en las microalgas (Guimera & Sales-Pardo, 2016).

2. Antecedentes

2.1. Potencial biotecnológico de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que pueden crecer de forma mono o multicelular. Tienen la capacidad de fijar hasta 200 veces más dióxido de carbono que los árboles, además de poseer la cualidad de almacenar en su interior moléculas de alto valor comercial (Morais Junior et al., 2020). Son fáciles de cultivar por los pocos requerimientos nutricionales, poco espacio de crecimiento y por la resistencia hacia las condiciones climáticas así como la capacidad de adaptación metabólica que presenta en las fluctuaciones a estas condiciones (Valverde et al., 2016).

Las microalgas más usadas con interés biotecnológico son *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas* y *Chlorella*, siendo estas dos últimas conocidas como organismos modelo por la gran cantidad de estudios que se han reportado. En la **Tabla 1** se muestran diferentes microalgas usadas en la producción de biocombustibles y su relación en porcentaje de lípidos que pueden producir (Montero-Sánchez, 2012).

Tabla 1.- Contenido de lípidos y productividad de biomasa en diferentes microalgas.

Especie	% de Lípidos	Prod. Lípidos (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Prod. Biomasa (g·L ⁻¹ ·d ⁻¹)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	15.3	2.4	0.020
<i>Nannochloris sp.</i>	51.0	1.46	0.003
<i>Dunaliella salina</i>	29.2	5.42	0.020
<i>Chlorella vulgaris</i>	27.8	42.49	0.15
<i>Haematococcus pluvialis</i>	13.4	11.96	0.090
<i>Scenedesmus sp.</i>	16.6	19.5	0.174

2.2. *Chlorella vulgaris*

Es una célula fotosintética de forma esférica, que ronda entre 2-10µm de diámetro, y posee estructura y compartimentos similares a las plantas. Posee sólo un cloroplasto capaz de sintetizar clorofila A y B para soportar la demanda metabólica de la célula y, además, de producir otros pigmentos como la luteína. Posee una rápida tasa de crecimiento en comparación con otras microalgas, y responde con facilidad a diferentes factores (estímulos bióticos y abióticos) que se refleja en diferentes variables de respuesta, como concentraciones de diferentes biomoléculas y metabolitos, modelos de crecimiento, generación de biomasa, entre otros. Esta microalga se considera que es una microalga oleaginosa por poseer un porcentaje superior al 10% de su peso correspondiente a lípidos (Loera-Quezada & Olguín, 2010). Soporta condiciones extremas y no se ve limitada en presencia de otro microorganismo en co-cultivo o en consorcios. Esta flexibilidad permite que sea una microalga ampliamente estudiada, llegando a convertirse en un organismo modelo para la aplicación de diferentes técnicas en laboratorios según el área de estudio. Por ejemplo, la acumulación de lípidos para la bioconversión a biodiesel en

el sector energético por estrategias físicas, genómicas y químicas (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

2.3. *Scenedesmus acutus*

Esta microalga normalmente se encuentra en forma de cenobios de entre 4 a 8 células de forma fusiforme, unidas paralelamente. Es de agua dulce, por lo que se suele encontrar en diferentes sistemas acuáticos en diversas condiciones climáticas. Al igual que *Chlorella vulgaris*, produce clorofila A y B y se considera una microalga oleaginosa, siendo uno de los sistemas para la producción de lípidos con fines bioenergéticos. Puede crecer en condiciones de poca o mucha luz, desarrollando mecanismos similares a las plantas superiores en la adaptación metabólica bajo estas condiciones, como la hiper-acumulación de biomoléculas como mecanismos de defensa, activación de fotosistemas según le beneficie, hasta bajar su metabolismo en condiciones de estrés para asegurar largos periodos hasta encontrar nuevamente los estímulos favorables para el crecimiento (Safi et al., 2014; Trainor, Cain, Shubert, Review, & Trainor, 2016).

2.4. Eficiencia fotosintética en cultivos de microalgas

La fotosíntesis es el proceso de las plantas, y otros organismos fotosintéticos como las microalgas, por el cual se produce la conversión de la energía solar a energía química en la forma de carbohidratos y oxígeno. La energía luminosa es absorbida por la clorofila y es convertida en compuestos de alta energía. Esto conlleva a la producción de oxígeno a partir de agua y a la generación simultánea de agentes reductores de alto nivel (NADPH) que son utilizados en la reducción de CO₂ (Calvin, 1950); sin embargo, estudios sugieren que la intensidad de luz que recibe el organismo fotosintético puede afectar este proceso de conversión catalítica de energía lumínica a energía química, produciendo fotoinhibición con una intensidad mayor de irradiancia o una foto limitación cuando esta es baja (Abu-Ghosh, Fixler, Dubinsky, & Iluz, 2016; Cheirsilp & Torpee, 2012).

2.5. Biosíntesis de lípidos en microalgas

Uno de los principales fenómenos que impacta la fotosíntesis es la biosíntesis de carbohidratos, que en consecuencia a la cascada de reacciones alimenta la generación de lípidos dentro de la célula, los cuales son compuestos orgánicos insolubles en disolventes polares pero solubles en disolventes no polares debido al predominio de hidrocarburos hidrófobos (Lenka et al., 2016). Se componen de ácidos grasos unidos por un enlace éster a un glicerol que forman parte estructural de las membranas en una célula, y en microalgas se producen biosintéticamente en el cloroplasto y terminan su andamiaje en el retículo endoplasmático para dar origen a triacilglicéridos (TAG) y fosfolípidos.

La biosíntesis de ácidos grasos se desarrolla en el plastidio, mientras que su elongación para la generación de triacilgliceroles se lleva a cabo en el retículo endoplasmático. Comienza en la conversión del acetil coenzima A (CoA) a malonil CoA catalizada por la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC), beta-carboxiltransferasa (BCX1) y biotina carboxilasa (BCR1), y el grupo malonil se transfiere a un cofactor de proteínas transportadoras de acilo mediante una enzima llamada malonil transferasa (MT). Las reacciones de condensación son catalizadas de forma cíclica por el complejo enzimático β -cetoacil ACP (KAS I, KAS II y KAS III) para después ser reducidas por la enzima β -cetoacil ACP reductasa (KAR) y deshidratada por hidroxilacil ACP deshidratasa (HAD) para luego ser nuevamente reducida por enoil ACP reductasa (ER) para formar ácidos grasos saturados como el ácido palmítico o ácido esteárico de 16 y 18 carbonos respectivamente, mientras que los ácidos grasos insaturados se producen por la acción de enzimas desaturasas sobre los ácidos grasos para promover dobles enlaces y con ello, cadenas insaturadas de carbonos para dar origen, por ejemplo, al ácido oleico de 18 carbonos con una insaturación (C18:1), principal precursor del biodiesel.

Posteriormente los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son liberados hacia el retículo endoplasmático por efecto de la acil ACP tioesterasa que hidroliza el acil ACP aciltransferasa y transfieren los ácidos grasos a glicerol-3-fosfato por acción de

glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) para dar origen al ácido lisofosfatídico que, catalizado por la lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) origina el ácido fosfatídico, que al ser desfosforilada por la fosfatasa (PAP) forma diacilgliceroles. La enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) transfiere un tercer ácido graso a estas estructuras y así se completa la biosíntesis de triacilgliceridos, los cuales son almacenados en cuerpos oleosos dentro de las microalgas (Salas-Montantes et al., 2018; Sharma, Gour, Kant, & Chauhan, 2015)

2.6. Tecnologías de fotoestimulación en cultivos de microalgas con luz LED

Se ha demostrado que el fotosistema II se ve mejorado por longitudes de onda roja y el fotosistema I por la luz azul, lo que convierte a este tipo de luz en las más adecuadas para el cultivo de microalgas. El uso de diferentes tipos de radiación, longitud de onda y fotoperiodos afectan el crecimiento de las microalgas, así como la concentración de ácidos grasos que una célula puede producir, por lo cual, diversos estudios sugieren que la manipulación de estas condiciones es una alternativa al mejoramiento metabólico para aumentar la producción de lípidos (Ra et al., 2016; Béchet et al., 2013). En 2014, un estudio realizado con *C. vulgaris* demostró que la longitud de onda afecta el crecimiento de las microalgas, y que la luz blanca y azul es más eficiente para el estímulo de generación de biomasa que la luz roja o verde. Además del tipo de radiación, si ésta se complementa con diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo, el crecimiento de la biomasa puede ser 50% mayor, lo que equivale a un ahorro económico en la producción a escala de la microalga (Blair, Kokabian, & Gude, 2014; Hultberg, Jönsson, Bergstrand, & Carlsson, 2014).

Particularmente los diodos emisores de luz (LED por sus siglas en inglés) son una de las luces más utilizadas para el crecimiento microalgal, siendo la principal fuente de energía en fotobiorreactores de crecimiento de plantas y algas para su estudio *in vitro* y producción en sistemas cerrados. La luz LED puede mejorar los cultivos de microalgas con una mezcla equilibrada de longitudes de onda, ya que responden de diversas maneras según la exposición, siendo la longitud de onda de 420-470nm

para luz azul y 660nm para luz roja las que muestran una mejor respuesta en el crecimiento (Schulze et al., 2017; Schulze et al., 2014).

En cultivos de *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis sp*, que son microalgas de interés biotecnológico, se lograron crecimientos del 24% en la producción de biomasa con LED azul a 450nm de longitud en comparación con luz blanca (Schulze et al., 2016). La luz LED azul permite en *C. vulgaris* reducir el tiempo de residencia en un fotobiorreactor, logrando acumular una mayor cantidad de lípidos en comparación a la luz blanca, así como una mayor acumulación de biomasa en el mismo periodo de incubación (Atta, Idris, Bukhari, & Wahidin, 2013). Además se ha demostrado que a nivel celular, la microalga muestra una mayor robustez frente a la luz roja, lo que permite también una mayor acumulación de lípidos de forma significativa (Kim, Lee, Park, & Choi, 2014). A pesar de conocer que los efectos que la luz LED a longitudes de onda ajustadas al tipo de microalga pueden mejorar metabólicamente una cepa, es necesario conocer cuáles son los mecanismos moleculares que se activan bajo estas condiciones, con el fin de mejorar las técnicas y caracterizar las rutas metabólicas para su mejor comprensión (Kumaresan et al., 2017). Una de las técnicas usadas para el estudio de los mecanismos de fijación del carbono y biosíntesis de moléculas como lípidos que derivan directamente de la actividad fotosintética, es el uso de los análisis transcriptómicos, que comprende el estudio de las moléculas de ácido ribonucleico (ARN) que posee una célula y sus procesos de regulación génica, funciones biológicas o expresión de redes de sistemas biológicos (Ronga 2019, & Karuturi, 2018) . En la actualidad la tecnología de secuenciación de ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés) permite el estudio eficiente de transcriptomas de forma rápida y eficiente, posicionándose como la técnica más usada para este tipo de análisis de perfil molecular (Kuram Tirumala et al., 2019; Chen & Wong, 2018).

3. Justificación

Las microalgas son de gran importancia debido a la cantidad y calidad de lípidos que acumulan, además de que son muy eficientes en la producción de biomasa en un corto periodo de tiempo y con muy pocos requerimientos. Los lípidos en las microalgas son una fuente importante para obtener bioproductos con alto valor agregado, tales como biodiesel y suplementos alimenticios, o bien, para su uso directo en la acuicultura como alimento vivo. Existen reportes que indican que al crecer los cultivos bajo luz azul o roja se estimula la producción de lípidos.

La falta de análisis del transcriptoma de microalgas oleaginosas limita nuestro conocimiento sobre los mecanismos que utilizan estos microorganismos para aumentar sus niveles de lípidos.

4. Hipótesis

El estudio del transcriptoma de las microalgas *Chlorella vulgaris* OW-01 y *Scenedesmus acutus* UTEX 72, expuestas a luz azul, roja y blanca, permitirá identificar rutas metabólicas relacionadas con la producción de lípidos precursores para la generación de biocombustibles de tercera y cuarta generación.

5. Objetivos

Objetivo general:

Analizar cuantitativamente el transcriptoma de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* asociado a la producción de lípidos por efecto de la luz azul y roja empleando la tecnología de secuenciación masiva NGS-RNAseq.

Objetivos específicos:

- a) Generar biomasa de las microalgas *C. vulgaris* y *S. acutus* bajo diferentes calidades de luz: azul (400-500 nm), roja (650-700 nm) y blanca de amplio espectro (400-700 nm).
- b) Estandarizar y aplicar metodologías para la cuantificación de lípidos y la extracción de ARN de alta calidad a partir de la biomasa generada.
- c) Determinar y comparar los parámetros cinéticos de crecimiento y la producción de clorofilas, lípidos neutros y lípidos totales en ambas microalgas bajo cada condición de luz.
- d) Caracterizar y comparar el perfil de ácidos grasos de cada microalga para evaluar el efecto de los tratamientos lumínicos en su composición.
- e) Generar y ensamblar *de novo* los transcriptomas de *C. vulgaris* y *S. acutus* mediante secuenciación masiva (RNA-Seq).
- f) Identificar, mediante análisis de expresión diferencial, las rutas metabólicas clave en la producción de lípidos que son moduladas por la luz azul y roja.
- g) Validar por RT-qPCR los perfiles de expresión de los genes más relevantes identificados en las rutas lipogénicas.

6. Materiales y métodos

6.1. Construcción de cámara de crecimiento

Con el objetivo de garantizar homogeneidad en las condiciones de cultivo, fue necesaria la construcción de cámaras de crecimiento, las cuales son un espacio físico cerrado que posee una fuente de iluminación que aísla del exterior el material biológico fotosintético, y garantiza su propagación.

Se diseñó una estructura cubica de 20"x15", con una altura de 20", para cada condición de luz (**Figura 1**), la cual permite instalar un panel LED en la parte superior. Fue construida con melamina, y en la parte interna recubierta con espejo para reflejar el máximo posible la radiación lumínica, y garantizar una respuesta homogénea en la intensidad de luz en todo el espacio.

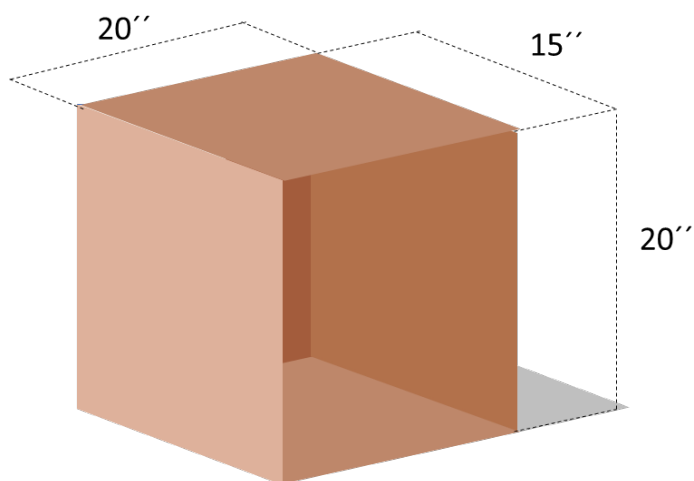


Figura 1.- Esquema de la cámara de crecimiento.

Con el uso de un luxómetro, se cuantificó la intensidad del flujo luminoso dentro de la cámara de crecimiento (**Figura 2**), y por medio de la plataforma “Convert Lux to PPFD”, se pudo obtener la cantidad de moles de fotones que son irradiados por segundo en un área de 1m² (μmol/s/m²) que la **Tabla 2** muestra, esto con el fin de definir el mejor lugar para colocar los reactores y mantener flujos lumínicos constantes.

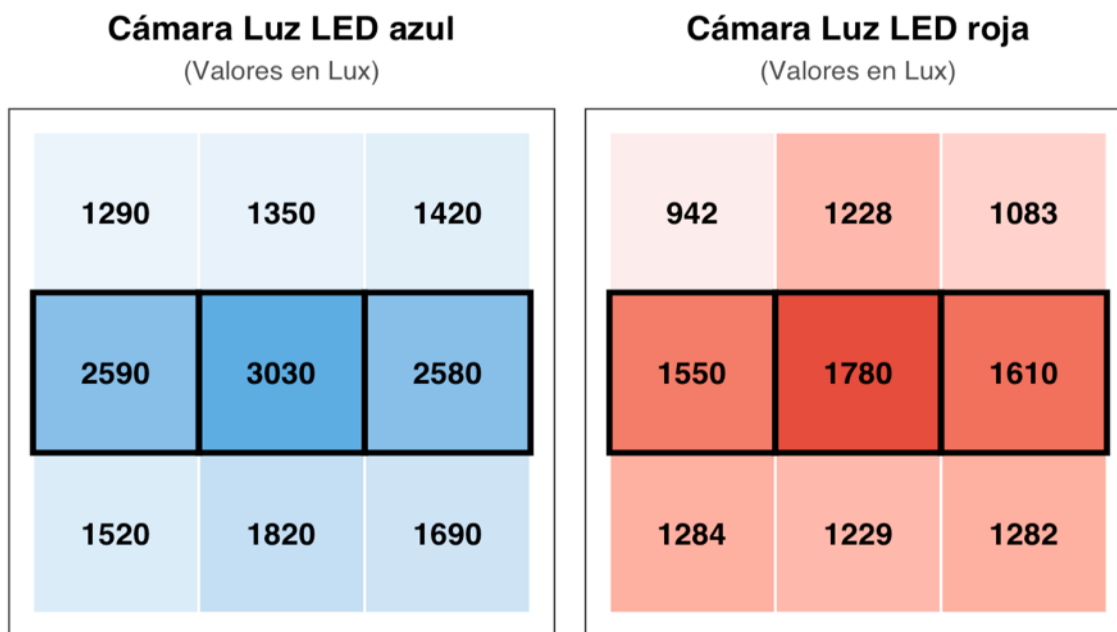


Figura 2.- Esquema de la toma de lectura de intensidad lumínica en Lux (lumen /m²) dentro de la cámara de crecimiento.

Tabla 2.- Cuantificación de Lux y equivalente en μmol/s/m² para los paneles LED.

Parámetro	LED Azul	LED Rojo
Lux	1560.00	2640.00
μmol/s/m ²	119.89	305.06

La estructura final soporta experimentación por lotes. Seis matraces de 1L con espacio suficiente para su manipulación, logrando correr dos condiciones por triplicado para cada especie de microalga, o bien, 10 reactores de 250mL o 12 reactores de 125mL según sea necesario, logrando mantener un flujo luminoso y una temperatura homogénea de 25°C en ambas cámaras, además de garantizar un espacio aislado del exterior (**Figura 3**).

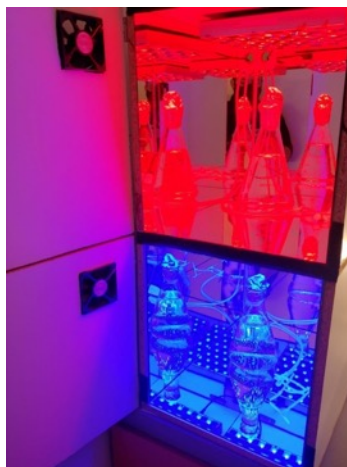


Figura 3.- Cámaras de incubación con luz LED roja y azul abiertas.

6.2. Propagación de las cepas de *C. vulgaris* y *S. acutus*

Las microalgas *C. vulgaris* y *S. acutus* fueron crecidas en el medio de cultivo Basal Bold; el suministro de carbono, en forma de aire atmosférico, se realizó mediante un sistema de aeración (difusión de aire) el cual se diseñó a base de mangueras de PVC flexible transparente de 2 mm de radio conectadas a una bomba de aire de 2.2 L/min; el flujo de aire en los experimentos está controlado mediante válvulas reguladoras de flujo de ¼ de pulgada.

Para la propagación de las cepas se prepararon pre-inóculos y se colocaron en 1 L de medio Bold utilizando una alícuota de 20 mL de cultivos stock y se mantuvieron a una temperatura de 25 °C con agitación continua y fotoperiodos de 16 h luz/8 h de oscuridad hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.1; la lectura se registró

mediante el espectrómetro GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA) a una longitud de onda de 750 nm.

Las curvas de crecimiento pueden mostrar el incremento de biomasa con respecto al tiempo y puede ser estimada de manera indirecta usando la densidad óptica de un cultivo. Esto permite conocer el comportamiento del crecimiento particular para cada tipo de microalga, identificar las diferentes etapas de crecimiento y estimar la duración de próximos experimentos. En este caso, ambos cultivos de microalgas fueron leídos a una absorbancia de 750nm, y por medio de la ecuación propuesta en trabajos anteriores en el equipo de trabajo, se puede estimar la concentración celular por mililitro:

$$\begin{array}{ll} \textbf{S. acutus} & y = 4.636E - 8x + 2.556E - 2 \quad R^2 = 0.9957 \\ \textbf{C. vulgaris} & y = 1.415E - 8x + 3.304E - 2 \quad R^2 = 0.9968 \end{array}$$

Donde: $y = DO\ 750\ nm$ $x = \#cel/ml$

(Castro Tapia, 2021)

Una vez que se alcanzó la DO deseada, se colocaron 150 mL del cultivo de cada microalga en matraces de 250 mL, eventualmente se colocó el sistema de venocllisis, el cual tiene como propósito garantizar condiciones axénicas del cultivo al momento de tomar muestra, pues al ejercer presión negativa en el espacio de toma de muestra, se utiliza una jeringa estéril en cada momento del muestreo, tomando el volumen necesario según se requiera (**Figura 4**). Los cultivos se mantuvieron con fotoperiodo 16h luz / 8h oscuridad y aireación constante de aire ambiental para suministrar CO₂ como fuente de carbono. Los reactores se posicionaron dentro de las cámaras de cultivo según el tratamiento de luz al que fueron sometidos; tres replicas para *C. vulgaris* y tres replicas para *S. acutus* en luz led azul, roja y blanca. Las microalgas se propagaron a temperatura de 25 °C, cada 24 h y se tomaron 3 muestras de 1 mL hasta que los cultivos llegaron a la fase estacionaria. Cada mililitro tomado fue destinado para diferentes procedimientos, como medición de absorbancia para estimación de densidad celular, cuantificación de clorofila, cuantificación de lípidos neutros; y al final de la cinética, la biomasa fue recuperada para la determinación de lípidos totales.



Figura 4.-Transferencia de 150 mL del pre-inóculo a reactores de 250mL que serán crecidos en diferentes condiciones de luz.

Para asegurar la correcta manipulación de las muestras y evitar contaminación lumínica, la cámara se encuentra en un cuarto oscuro, en el cual para entrar el operador fue auxiliado con una linterna RGB que permite seleccionar el tipo de luz con cual estaría trabajando. Por ejemplo, luz roja para los tratamientos con luz LED roja y facilitar la manipulación dentro del cuarto oscuro (**Figura 5**). Una vez dentro de la cámara, los reactores no fueron expuestos a ningún tipo de luz diferente a su longitud de onda hasta el final del experimento (**Figura 6**).



Figura 5.- Interior de las cámaras de cultivo. Las cámaras de cultivo para luz LED roja y azul mantienen la propagación de las cepas.



Figura 6.- Luz auxiliar en el cuarto oscuro. Dentro del cuarto oscuro, se emplean diferentes tipos de luz para la manipulación dentro del mismo, siendo la verde utilizada para el acondicionamiento del material de muestreo, pero al momento de trabajar con muestra

En este caso particular, se utilizó la absorbancia a 750nm como indicador de la concentración celular de las microalgas. Se aplicó una ecuación previamente propuesta por otros investigadores en el equipo de trabajo para realizar esta estimación. Las microalgas fueron cultivadas en medio Bold basal y se compararon las diferencias entre aquellas expuestas a luz blanca, azul y roja.

6.3. Parámetros cinéticos de las cepas de *C. vulgaris* y *S. acutus*

Para poder hacer uso de este modelo matemático representado por la ecuación (Mohd, Yasin, & Takriff, 2021):

$$Y = y_{\max} \frac{1}{\frac{\mu_{\max} * e}{y_{\max}} (\lambda - t) + 1}$$

Los datos obtenidos en la cinética de crecimiento en cel/mL deben ser transformados a su versión logarítmica usando LogN/No, que permiten definir una curva sigmoidea, correspondiente al típico crecimiento poblacional. El modelo cinético de Gompertz se realizó con el lenguaje de programación RStudio para

encontrar las constantes y con ellas describir los parámetros cinéticos. La ecuación $Y=a*\exp(-\exp(b-c*x))$ es la sintaxis de la resolución de la ecuación de Gompertz que se usará en la estimación dentro del software.

Para evaluar el ajuste del modelo, se correlacionan los datos experimentales con los valores predichos por la ecuación para obtener el coeficiente de correlación (R^2). Un valor de cercano a 1 confirma que el modelo describe adecuadamente el comportamiento microbiano típico; un valor significativamente menor indicaría que la cinética de crecimiento no es estándar y la experimentación debería repetirse. Gráficamente, esta correlación genera una curva sigmoidea que permite visualizar las fases de crecimiento y la correspondencia entre los datos reales y la predicción del modelo. Finalmente, el software realiza un análisis no lineal para calcular las constantes (a, b, y c) de la ecuación, las cuales se utilizan para estimar los parámetros cinéticos fundamentales: la velocidad máxima de crecimiento (μ_{Max}), la fase de latencia (λ) y el tiempo de generación (G).

6.4. Extracción y cuantificación de clorofila

Durante la toma de muestra diaria en las cinéticas de crecimiento, uno de los microtubos de 1,500 μ L que se recolectaron fue destinado para el análisis de clorofila. Para la recolección de biomasa generada, los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 10,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de agua destilada para posteriormente resuspender y provocar un lavado de la biomasa. Nuevamente se centrifugó la biomasa en las mismas condiciones para eliminar el agua que se adicionó y se añadió 1.5 mL de metanol y se homogenizó dentro del tubo. Se incubó a una temperatura de 60°C durante 10 min para permear la membrana celular y permitir el paso del solvente, y posteriormente fueron sometidas a una refrigeración durante 24 h a 4°C para realizar una extracción por solvente en frío, y así no degradar los pigmentos. Trascurridas las 24 h se centrifugaron los tubos a 10,000rpm durante 5 min para separar los residuos celulares del extracto rico en pigmentos, por lo que se recuperó el sobrenadante y se colocó en una celda

de medición espectrofotométrica, y se leyó en las longitudes de onda 652 nm y 665 nm y por medio de las siguientes ecuaciones, se estimó la concentración de Chl a y Chl b, y con ellas, la concentración de clorofila total en µg/mL que se leen por triplicado (Castro Tapia, 2021).

Clorofila a: $Ch\ a = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4}$

Clorofila a+b: $Ch\ a+b = 1.44\ A_{665.2} + 24.93\ A_{652.4}$

Clorofila b: $Ch\ b = 34.09\ A_{652.4} - 15.28\ A_{665.2}$

Se cuantificó la concentración de clorofila en el día cero (T0) como medida control para evidenciar la estimulación de su producción en las diferentes longitudes de onda, y al final de la cinética (15 días = T15) se mide para cuantificar y estimar el estado fisiológico de *C. vulgaris* y *S. acutus*.

Para el análisis entre tratamientos y control de cada microalga se realizó un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.05$) utilizando la prueba de Dunnett para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos sometidos a diferente longitud de onda, y utilizando el lenguaje de programación Rstudio y se determinó si existen estas diferencias.

6.5. Extracción y cuantificación de lípidos neutros

Durante la toma de muestra diaria en las cinéticas de crecimiento, uno de los microtubos de 1,500µL que se recolectaron fue destinado para la cuantificación de lípidos neutros. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente para separar la biomasa del medio Bold donde crecieron, y eliminar alguna contaminación que pudiera estar presente durante el crecimiento celular, posterior a ello se resuspendió en 1mL de medio Bold estéril para homogenizar la muestra.

Previo a la cuantificación, se registró una lectura en las placas de fondo oscuro donde se estimó la fluorescencia. Estas lecturas se tomaron en el equipo GloMax®-Multi Microplate Reader (Promega Corporation, Madison, WI, USA), utilizando el

filtro óptico Verde (525nm de Excitación y 580–640nm de Emisión) del módulo de fluorescencia.

Una vez que se tomaron los valores de la placa vacía, en cada pozo se colocaron 200 µL de muestra de cada tratamiento por triplicado y nuevamente se tomó lectura en el equipo. Después de registrar la lectura, se añadieron 5 µL de rojo Nilo (2.5 µg/mL en isopropanol) y se dejó reposar por 5 min a 40°C antes de realizar una nueva lectura. Posteriormente se restó el valor de la fluorescencia obtenida después de añadir la solución de rojo Nilo al valor de la fluorescencia de las microalgas sin solución y la lectura de las placas vacías. Por interpolación, usando la ecuación dada por la curva de trioleína, se estimó la concentración de lípidos neutros presente en las microalgas. Se cuantificó la concentración al final de la cinética de *C. vulgaris* y *S. acutus*, que fue a los 15 días después de iniciar la propagación.

Para el análisis entre tratamientos y control de cada microalga se realizó un análisis de varianza (ANOVA $p < 0.05$) utilizando la prueba de Dunnett para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos sometidos a diferente longitud de onda, y utilizando el lenguaje de programación RStudio se determinó si existen estas diferencias.

6.6. Extracción de lípidos totales por radiación infrarroja (IR)

Para la extracción de lípidos, se usó la totalidad de la biomasa al final de la cinética, y para su recuperación en tubos cónicos de 50mL se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente para separar la biomasa del medio Bold donde crecieron las células. La biomasa recolectada se secó en una estufa a 60°C durante 8 h y se maceró en mortero hasta obtener un polvo seco. Posteriormente se agregaron 0.20 ± 0.001 g de biomasa seca de cada microalga bajo cada tratamiento a un matraz de fondo redondo de 250 mL acoplado a un condensador con solvente de extracción (en proporción 0.57/2.43 de acetato de etilo y metanol) según la relación 1:129.9 m/v. Los lípidos se extrajeron bajo irradiación infrarroja con la ayuda de una lámpara de IR (250 W) colocada a 2 cm de distancia de la solución por 43 min (**Figura 7**).

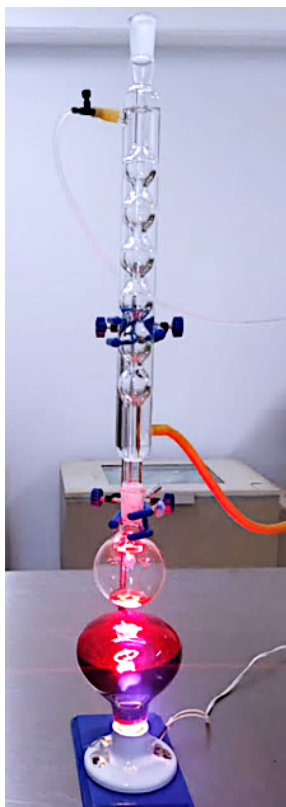


Figura 7.-Sistema de extracción de lípidos totales con radiación infrarroja.

Previo al análisis gravimétrico, se pusieron en peso constante tubos cónicos de 50mL que recibieron el filtrado de la extracción. Al terminar el tiempo de extracción, se filtraron las soluciones para eliminar los desechos celulares del extracto lipídico y en los tubos cónicos de 50 mL se dejaron secar por 8 h a 60°C. Una vez que transcurrió la evaporación del solvente, quedó un precipitado color verde oscuro, el cual se pesó, y por diferencia de peso se estima el peso de los lípidos totales extraídos. Para calcular el rendimiento de la extracción, se usó la ecuación (Hadrich et al., 2018):

$$\text{Rendimiento de lípidos} = \frac{\text{Peso de aceite extraído (g)}}{\text{Peso de biomasa seca (g)}} \times 100$$

que permite conocer el porcentaje de lípidos totales existentes en cada tratamiento de microalgas con respecto al peso seco obtenido al final de las cinéticas de crecimiento.

6.7. Obtención y análisis de ADNc

En la obtención de genotecas para RNA-seq, es importante conocer el momento donde los transcritos pueden tener una concentración mayor para poder ser evaluados, es por eso que se sometieron a las microalgas en condiciones de luz roja, azul y blanca como control, y durante su crecimiento realizar extracción de ARN en cada etapa de crecimiento importante, como la fase exponencial, estacionaria e inicio de muerte, por lo que se realizó la extracción en los días 7, 12 y 15.

Para la obtención del material nucleico, un paso crítico y fundamental para el éxito de los análisis de expresión génica y la secuenciación masiva, se realizó una evaluación comparativa de diferentes protocolos comerciales de extracción de ARN. El objetivo era seleccionar el método que garantizara la mayor pureza, concentración e integridad del ARN extraído a partir de las microalgas *C. vulgaris* y *S. acutus*.

Se evaluaron tres kits comerciales: Quick-RNA™ Plant Miniprep (Zymo Research), un kit de Invitrogen y el PureLink™ RNA Mini Kit (Ambion). La calidad del ARN total extraído con cada método fue inspeccionada mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes, lo que permite visualizar la integridad de las bandas correspondientes al ARN ribosomal (ARNr), indicadores clave de la calidad del material.

Una vez generados los ADNc se cuantificaron, y se realizó una PCR con los cebadores para el 18S para evaluar su integridad y verificar que sean aptas para el análisis de expresión en PCR tiempo real.

6.8. Evaluación de genes implicados en la síntesis de lípidos

Para la evaluación de los posibles genes implicados en la síntesis de lípidos en las microalgas, se propuso trabajar con genes codificantes de enzimas ya descritos en su función anteriormente, por lo que se realizó un diseño de oligonucleótidos empleando la plataforma de NCBI y las herramientas Oligocalc, OligoAnalyzer y SnapGene® 2.3.1. Para ello, se buscaron diferentes ID de genes correspondientes a las secciones codificantes para las enzimas involucradas que presentaron mayor probabilidad de réplica, de acuerdo a la literatura, en toda la síntesis de triacilglicéridos; además de genes constitutivos para cada microalga.

Para la estandarización las condiciones de amplificación con los oligos diseñados, se realizaron extracciones de ADN para cada microalga con PureLink® Genomic DNA kit de Invitrogen.

Con este material genético, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para determinar la presencia de los genes de interés en el ADN genómico de cada microalga y, fundamentalmente, para validar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 25 μ L, conteniendo una mezcla de reacción estándar compuesta por: buffer de PCR 1X, una concentración optimizada de $MgCl_2$, 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 0.5 μ M de cada oligonucleótido (Forward y Reverse), 1.25 U de ADN polimerasa *Taq* y aproximadamente 50 ng de ADN genómico como templado. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una temperatura de anillamiento optimizada para cada par de oligos (entre 59-60°C) por 40 segundos, y una extensión a 72°C por 45 segundos; finalizando con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Posterior a la amplificación, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se preparó un gel al 2% (p/v) en buffer TAE 1X, una concentración elevada seleccionada para obtener una mejor resolución y separación de los amplicones esperados, cuyo tamaño era relativamente pequeño (entre 83 y 257 pb). Una alícuota de cada producto de PCR se mezcló con un buffer de carga 6X y se depositó en los pozos del gel. Se incluyó un marcador de peso molecular (escalera de ADN) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados. La corrida electroforética se realizó a 90 V por 50 minutos. Finalmente, el gel fue teñido con un agente intercalante (bromuro de etidio) y las bandas de ADN fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador. Se consideró una validación exitosa la observación de una única banda nítida del tamaño esperado para cada gen.

6.9. Evaluación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.

Para el análisis de expresión por cuantificación relativa se utilizó el kit SyBR Green Master Mix Fast (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante en reacciones de 10µL con 40 ciclos. Todas las reacciones se prepararon por triplicado en una placa de grado óptico de 96 pocillos y se realizó en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System. Posterior a ello, los resultados fueron analizados utilizando el software Real-Time PCR System (Applied Biosystems) Applied Biosystems StepOne™, usando el gen 18S constitutivo como gen de referencia para normalizar la cuantificación de los genes.

6.10. Identificación y cuantificación de ácidos grasos.

La identificación y cuantificación del perfil de ácidos grasos se realizó a partir de los extractos de lípidos totales obtenidos de la biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Las muestras fueron recolectadas al final de la cinética de crecimiento (día 15) para cada uno de los tres tratamientos lumínicos estudiados: luz blanca (control), luz LED azul y luz LED roja.

Previo al análisis, los lípidos extraídos fueron sometidos a una reacción de transesterificación para convertir los ácidos grasos en sus formas de ésteres metílicos (FAMES), que son más volátiles y adecuados para el análisis cromatográfico. La separación e identificación de estos FAMES se llevó a cabo usando un sistema de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de flama (GC-FID). La identificación de cada ácido graso se basó en la comparación de los tiempos de retención de los picos en las muestras con los de un estándar comercial de FAMES de composición conocida.

Para la cuantificación precisa, se utilizó ácido heptadecanoico como estándar interno, añadido a las muestras antes de la derivatización. El porcentaje relativo de cada ácido graso se calculó a partir de las áreas de los picos. Todo el procedimiento, desde el cultivo hasta el análisis, se realizó por triplicado biológico y técnico para garantizar la robustez y reproducibilidad de los resultados. Este protocolo se basa en la metodología descrita por Salazar-Montes y colaboradores en 2018 (Castro-Tapia et al., 2022).

6.11. Número de cetano

El número de cetano (NC) es el parámetro estándar universalmente aceptado para cuantificar la calidad de ignición de los combustibles para motores diésel, incluyendo el biodiésel (Sánchez Borroto, Piloto Rodríguez, Goyos Pérez, & Ferrer Frontela, 2012). Este valor numérico adimensional es inversamente proporcional al retardo de la ignición, que corresponde al lapso entre la inyección del combustible en la cámara de combustión y el inicio de la combustión. Un número de cetano elevado indica un retardo de ignición corto, lo que se traduce en un arranque del motor más suave y rápido, una reducción del ruido de combustión y una disminución en la emisión de contaminantes como hidrocarburos no quemados y monóxido de carbono (Sánchez Borroto et al., 2012). Por consiguiente, la determinación del NC es un paso crítico para evaluar la viabilidad y el potencial comercial de cualquier biocombustible desarrollado.

La determinación del NC se puede realizar mediante la relación entre la estructura molecular de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs), que son los componentes principales del biodiésel, y su comportamiento durante la combustión. La facilidad con la que un combustible se autoenciende depende de la estabilidad de sus enlaces químicos. Moléculas con cadenas largas, lineales y saturadas, como los ésteres metílicos de los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), se descomponen más fácilmente bajo la presión y temperatura de la cámara de combustión, lo que resulta en un retardo de ignición corto y, por lo tanto, un NC alto. Por el contrario, la presencia de insaturaciones (dobles enlaces) en la cadena hidrocarbonada, como en los ésteres de los ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3), aumenta la estabilidad de la molécula. Se requiere más energía para romper estos dobles enlaces, lo que prolonga el retardo de la ignición y disminuye significativamente el número de cetano. De este modo, el perfil de FAMEs de un biodiésel encapsula la información fundamental necesaria para predecir su calidad de ignición (Sánchez Borroto et al., 2012).

En este contexto, el trabajo de Sánchez-Borroto et al. (2012) es particularmente relevante, ya que desarrollaron y validaron modelos de alta precisión para la estimación del NC a partir de la composición de FAMEs, utilizando tanto regresión lineal múltiple como redes neuronales artificiales. Sus modelos, entrenados con una extensa base de datos de 48 tipos de biodiésel, demostraron una capacidad predictiva superior, con coeficientes de correlación mayores al 95% y un error absoluto medio de solo 1.6 para el modelo redes neuronales. Es por eso que se empleó el modelo de regresión lineal múltiple propuesto por dichos autores, cuya ecuación se basa en los porcentajes en peso de los principales FAMEs:

$$\text{Número de cetano} = (0.342 * LL) + (0.427 * L) + (0.561 * O) + (0.742 * P) + (0.858 * E)$$

donde LL, L, O, P y E representan los porcentajes de los ésteres metílicos de los ácidos linolénico, linoleico, oleico, palmítico y esteárico, respectivamente.

Los valores de NC estimados se comparan con los requisitos mínimos estipulados en las normativas que rigen los mercados de América del Norte y Europa. Estas

normas representan diferentes niveles de calidad y aplicaciones, desde el diésel de uso general (que puede contener mezclas de bajo porcentaje de biodiésel) hasta el biodiésel puro de alta especificación (B100) destinado a ser utilizado como componente de mezcla. La norma ASTM D975 establece las especificaciones para combustibles diésel de petróleo en Estados Unidos, permitiendo mezclas de hasta un 5% de biodiésel (B5) y exigiendo un NC mínimo de 40 (ASTM International, 2021). La Norma Oficial Mexicana NOM-EM-005-CRE-2015, por su parte, establece para el diésel automotriz un NC mínimo de 45 Comisión Reguladora de Energía, 2015). A un nivel más exigente, la norma ASTM D6751 regula el biodiésel puro (B100) que se utiliza como material de mezcla, requiriendo un NC mínimo de 47 (ASTM, 2020) para asegurar que la mezcla final cumpla con los estándares. Finalmente, la norma europea EN 14214, considerada una de las más estrictas a nivel mundial, exige un NC mínimo de 51 para el B100, reflejando los requerimientos de la tecnología de motores avanzada en esa región (European Committee for Standardization, 2012).

6.12. Análisis transcriptómico

Los datos transcriptómicos fueron obtenidos a través de la secuenciación masiva de ARN total obtenido de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. Se llevó a cabo el procesamiento de las muestras a través del paquete de servicios RNA-Seq proporcionado por Zymo Research, que incluyó la limpieza de ARN, la elaboración de bibliotecas y la secuenciación, logrando una cobertura cerca de 30 millones de pares de lecturas por muestra.

6.12.1. Análisis de calidad y filtrado de lecturas

Para evaluar la calidad de las lecturas pareadas, tanto las crudas obtenidas de la secuenciación como las filtradas, se empleó FastQC (Andrews, 2010), versión 0.11.8. Este análisis incluyó parámetros fundamentales como la cantidad de lecturas, la longitud promedio, el rango de las lecturas y el porcentaje de contenido GC.

Posteriormente, las lecturas fueron sometidas a un proceso de filtrado mediante Trim Galore v0.6.6, el cual eliminó adaptadores y secuencias de baja calidad o no deseadas. Los parámetros aplicados correspondieron a los valores predeterminados del software, siguiendo lineamientos ampliamente documentados en la literatura (Bryant et al., 2017; Huerta-Cepas et al., 2019).

6.12.2. Ensamblado *de novo* del transcriptoma

128 núcleos de procesamiento y una capacidad de 512 GB de memoria RAM. Por su parte, el análisis en el CCG utilizó 64 núcleos y 1 TB de memoria RAM.

En ambos sistemas fue necesaria la activación de la alternativa `-normalize_reads`, creada para modificar la cobertura de las lecturas y reducir posibles errores en el ensamblado. Esto permitió la creación de un transcriptoma fiable e integral al utilizar eficazmente las habilidades computacionales de ambas instituciones. Además, se definieron parámetros específicos, como un límite de longitud mínima para los contigs diseñados con 200 pares de bases y la alteración de `-max_memory` a 500 GB para optimizar el uso de los recursos tecnológicos. Se realizó una evaluación de la calidad del ensamblado a través del uso de Trinity Stats y BUSCO (Simão et al., 2015), herramientas que confirmaron la totalidad, redundancia y consistencia del transcriptoma completado.

6.12.3. Anotación funcional de genes a partir del ensamblado *de novo*

Las anotaciones incluyeron la identificación de rutas metabólicas, proteínas funcionales y genes relacionados con procesos específicos. Para validar la calidad de las anotaciones, se aplicaron filtros de e-value ($\leq 1e-5$) y se realizaron revisiones manuales de los genes más relevantes. Este enfoque permitió generar una base de datos de transcritos anotados con información funcional, lista para su integración en análisis posteriores, como el estudio de patrones de expresión diferencial bajo distintas longitudes de onda de luz.

6.12.4. Análisis de los Genes Diferencialmente Expresados (DEGs) utilizando categorías tipo Clústeres de grupos ortólogos (COG)

El estudio de genes diferencialmente expresados (DEGs) en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* bajo diferentes longitudes de onda de luz se llevó a cabo utilizando instrumentos bioinformáticos que facilitaron la identificación de sus funciones y su categorización en grupos funcionales denominados COG (Clusters of Orthologous Groups).

Los datos se examinan de manera estadística con el paquete edgeR en R para identificar qué genes presentaban alteraciones importantes en su expresión. Luego, los resultados se registraron automáticamente a través de los programas Trinotate y EggNOG v5.0. Como medida extra, se examinaron manualmente las anotaciones para confirmar su exactitud y que estuvieran en concordancia con los procesos biológicos particulares de las microalgas. Para la categorización en grupos funcionales COG, se utilizaron instrumentos especializados de EggNOG, los cuales organizaron los genes de acuerdo a sus funciones generales como el metabolismo energético, la señalización celular y el transporte, además de abarcar aquellos genes cuya función aún no ha sido definida. Finalmente, se visualizaron los datos procesados utilizando los paquetes ggplot2 y pheatmap en R, creando diagramas que simplificaron la comprensión de los resultados.

6.12.5. Análisis funcional con KEGG

El estudio funcional de los genes derivados del nuevo ensamblaje del transcriptoma de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* se llevó a cabo utilizando la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), lo que facilitó la asociación de los genes expresados de manera diferenciada con vías metabólicas y procesos biológicos particulares. Los transcritos producidos se anotaron con Trinotate, mientras que las proteínas pronosticadas fueron procesadas a través de BLASTP para vincularlas con números KEGG (KO). Luego, estos identificadores fueron mapeados en KEGG Mapper, lo que facilitó la categorización de los genes

en rutas metabólicas y procesos biológicos pertinentes. Los mapas producidos proporcionaron una ilustración visual de las interacciones genéticas y su implicación en caminos determinados. Además, se realizó un estudio de enriquecimiento funcional empleando instrumentos como clusterProfiler en R, con la finalidad de reconocer caminos metabólicos significativamente representados de acuerdo a las condiciones experimentales analizadas. Finalmente, se realizaron revisiones manuales a las anotaciones y resultados obtenidos para confirmar su relevancia en el ámbito biológico de las microalgas, particularmente en relación con las diferentes longitudes de onda de luz utilizadas.

6.13. Validación de los resultados del RNA-Seq mediante RT-qPCR

Para validar los resultados obtenidos del análisis bioinformático de genes, se realizó un ensayo de RT-qPCR, para lo cual, el ARN total se extrajo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* empleando un protocolo optimizado para plantas (kit Quick-RNA™ Plant Miniprep de Zymo Research), asegurando su calidad con mediciones espectrofotométricas y análisis en geles de agarosa. Tras el tratamiento con DNasa para eliminar restos de ADN genómico, se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir del ARN purificado.

Para validar los resultados obtenidos del análisis bioinformático (sección 6.12), se seleccionó un subconjunto de los genes que mostraron la expresión diferencial más significativa o que eran de particular relevancia biológica según el análisis funcional (GO y KEGG). Para este grupo de genes de interés, se diseñó un nuevo conjunto de cebadores específicos, siguiendo los mismos principios bioinformáticos descritos en la sección 6.8. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador utilizando una mezcla con SYBR Green (SYBR Green Master Mix), cebadores específicos y diluciones de ADNc. Las condiciones del protocolo incluyeron etapas de amplificación y una curva de disociación para confirmar la especificidad de los productos generados.

Los resultados se analizaron empleando un gen constitutivo como referencia para normalizar la expresión y compararon los niveles de transcripción bajo diferentes

condiciones de iluminación (blanca, roja y azul) en tiempos específicos empleando el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ en el software Bio-Rad CFX Manager. Este enfoque permitió confirmar la expresión diferencial observada en los análisis previos, con réplicas técnicas y biológicas que garantizaron la confiabilidad de los datos obtenidos.

7. Resultados

7.1. Propagación de las cepas de *C. vulgaris* y *S. acutus*

En el estudio realizado, se investigó el crecimiento de las microalgas utilizando curvas de crecimiento y la medición de la densidad óptica de los cultivos. Esta metodología permitió obtener estimaciones indirectas de la biomasa en función del tiempo, lo cual resulta útil para comprender el comportamiento de crecimiento específico de cada tipo de microalga. Además, se logró identificar las diferentes etapas de crecimiento y se estimó la duración de futuros experimentos.

Los resultados obtenidos indican que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* bajo las diferentes condiciones de luz mencionadas. Esto sugiere que estas microalgas no son sensibles a los diferentes espectros de luz evaluados en términos de su crecimiento (**Figura 8**).

Además, se observó que las microalgas no mostraron una fase de latencia en su crecimiento, lo que implica que comenzaron a crecer activamente desde el inicio del experimento. La etapa estacionaria, que es una etapa en la que el crecimiento se detiene o se ralentiza considerablemente, comenzó a definirse a partir del día 10 del experimento.

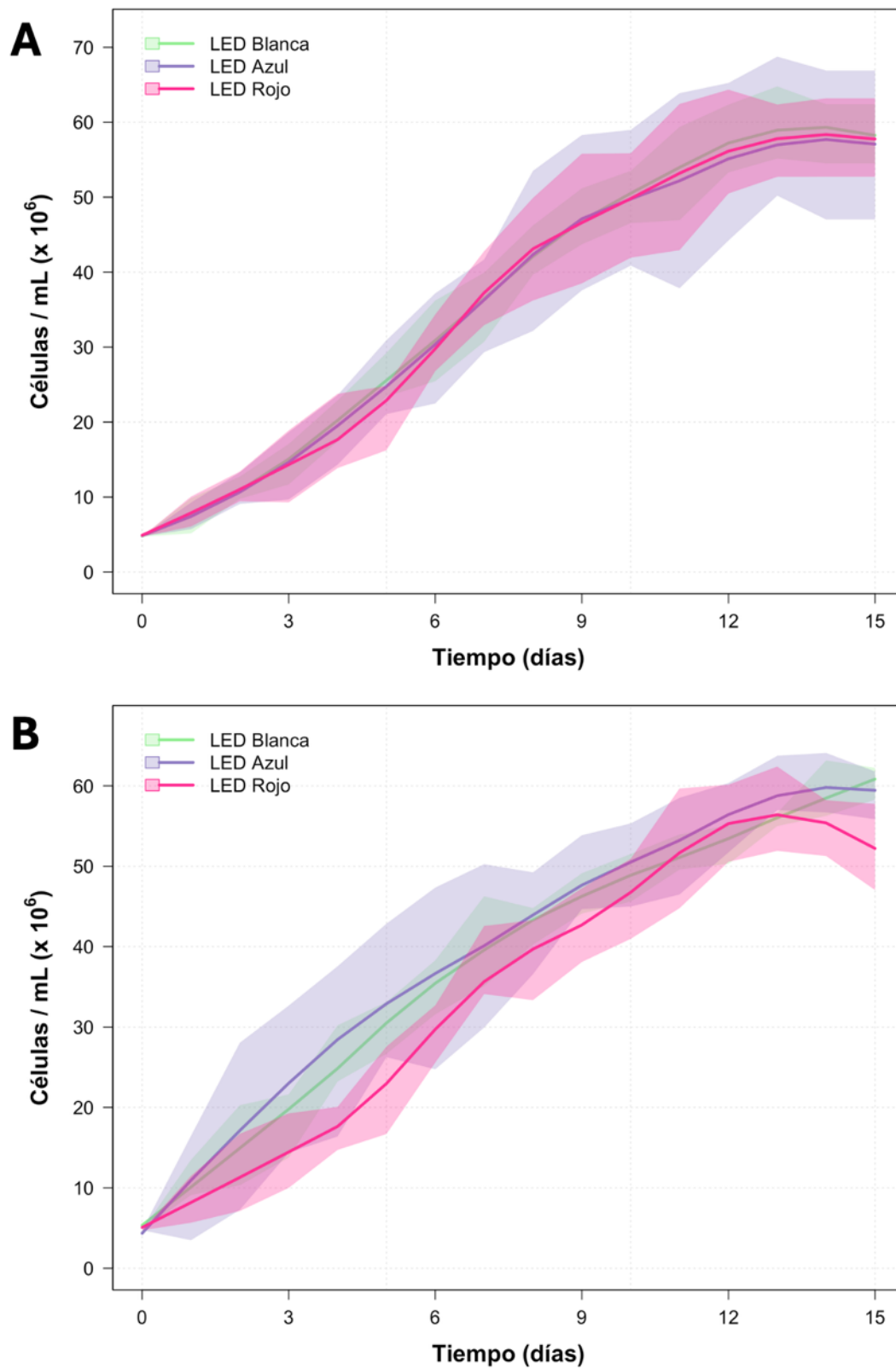


Figura 8.- a) Cinética de crecimiento de *C. vulgaris* y b) *S. acutus*.

7.2. Parámetros cinéticos de las cepas de *C. vulgaris* y *S. acutus*

Los resultados muestran para ambas microalgas que los puntos de datos reales se encuentran muy cerca de las predicciones realizadas por el modelo de Gompertz ($R=.96$ para *C. vulgaris* y $R=.93$ para *S. acutus*), lo cual indica una adecuada correlación en ambos tratamientos de luz (**Figura 9**).

Se observa que, en la fase de latencia (λ), los valores son negativos, lo que sugiere que, al momento de agregar el pre-inóculo al reactor, las microalgas se encuentran en una fase de crecimiento totalmente exponencial. Esto indica un rápido inicio de la fase de crecimiento activo.

El tiempo de generación celular (G) es otro parámetro evaluado a partir de los datos cinéticos, y en general, se mantiene por debajo de las 2 horas. Esto indica que las microalgas tienen una alta capacidad de reproducción y crecimiento rápido.

Al analizar el modelo cinético de Gompertz, se puede determinar un tiempo de cosecha sugerido, que se encuentra alrededor de los doce o trece días. En este punto, los cultivos de ambas microalgas presentan un comportamiento similar entre sí y se encuentran en una fase estacionaria completa. Esto puede ser útil para realizar comparaciones entre tratamientos o planificar la cosecha de los cultivos.

También se puede observar que la μ_{Max} , que es la tasa máxima de crecimiento específico, es ligeramente mayor en ambas microalgas cuando se someten a luz azul en comparación con los otros tratamientos de luz. Esto sugiere que la luz azul puede tener un efecto estimulante en la tasa de crecimiento de estas microalgas en particular.

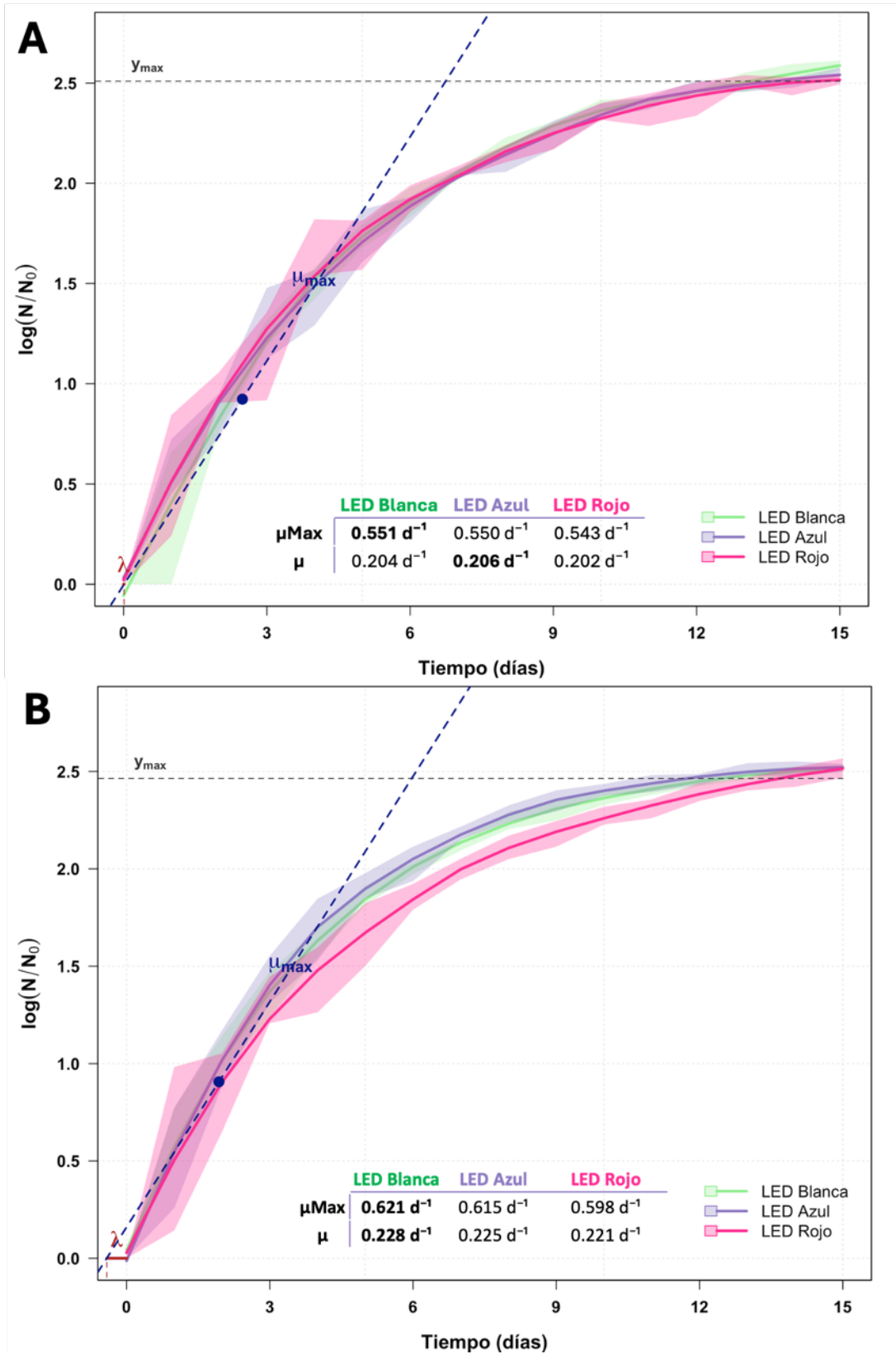


Figura 9.- Modelo cinético de Gompertz en a) *C. vulgaris*, b) *S. acutus*.

7.3. Extracción y cuantificación de clorofila

Se observó que, en ambos tratamientos de luz, se presentó un aumento en la concentración inicial de clorofila en comparación con los niveles iniciales. Este aumento indica que las microalgas fueron capaces de desarrollarse y responder a las diferentes longitudes de onda de luz, lo que estimuló la producción de clorofila y les permitió continuar con su metabolismo y crecimiento celular. La concentración de clorofila en ambas microalgas alcanzó aproximadamente los 12.50 $\mu\text{g/mL}$, partiendo de una concentración inicial de alrededor de 3 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 10**).

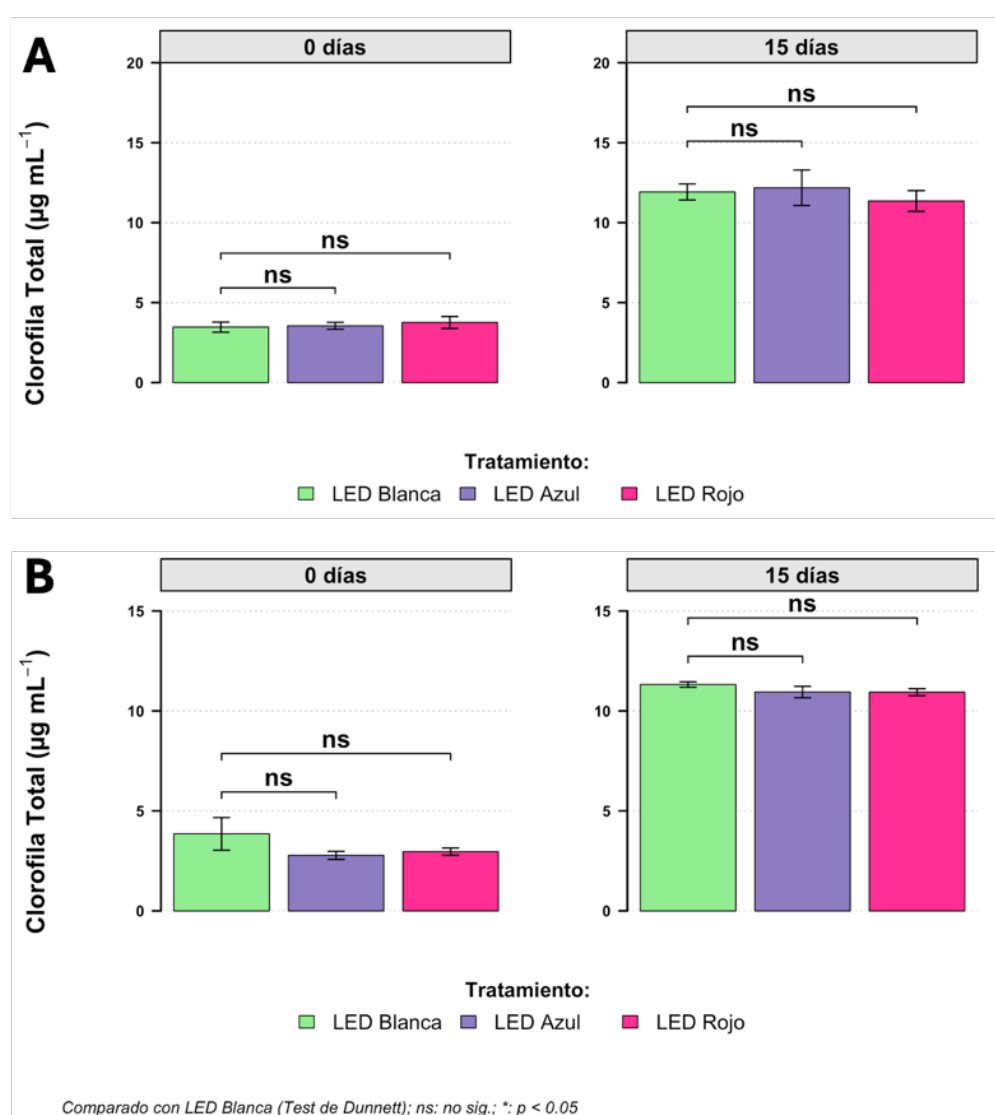


Figura 10.- a) Concentración de clorofila total en *C. vulgaris* y **b)** *S. acutus* al inicio (T0) y final de las cinéticas de crecimiento (T15).

Es importante destacar que la clorofila es esencial para la fotosíntesis, el proceso mediante el cual las microalgas convierten la energía lumínica en energía química, utilizada para su crecimiento y metabolismo. El hecho de que las microalgas respondieran positivamente a las diferentes longitudes de onda de luz, mostrando un aumento en la concentración de clorofila, indica que son capaces de adaptarse y utilizar eficientemente la luz disponible para su beneficio.

Estos resultados son relevantes, ya que proporcionan información sobre la respuesta de las microalgas a diferentes condiciones de luz y cómo esto puede influir en su crecimiento y metabolismo. Además, sugieren que la elección de una longitud de onda específica de luz puede ser utilizada como una estrategia para estimular la producción de clorofila y mejorar el rendimiento de las microalgas en aplicaciones relacionadas, como la producción de biocombustibles o la remediación ambiental.

7.4. Extracción y cuantificación de lípidos neutros

Después de 15 días de propagación, se observó que la concentración de lípidos neutros fue de cerca el 40mg/mL para *C. vulgaris* y *S. acutus* cuando se cultivaron en luz blanca (**Figura 11**).

En cuanto a los experimentos con luz LED azul, no se encontraron diferencias significativas en la concentración de lípidos totales en comparación con el control de luz blanca. Esto sugiere que la luz azul no tuvo un impacto significativo en la acumulación de lípidos en ambas especies de microalgas.

Sin embargo, en el caso de la luz LED roja, se observó una concentración inferior de lípidos totales, aproximadamente del 20 mg/mL. Esto indica que la luz roja tuvo un efecto negativo en la acumulación de lípidos en comparación con el control de luz blanca.

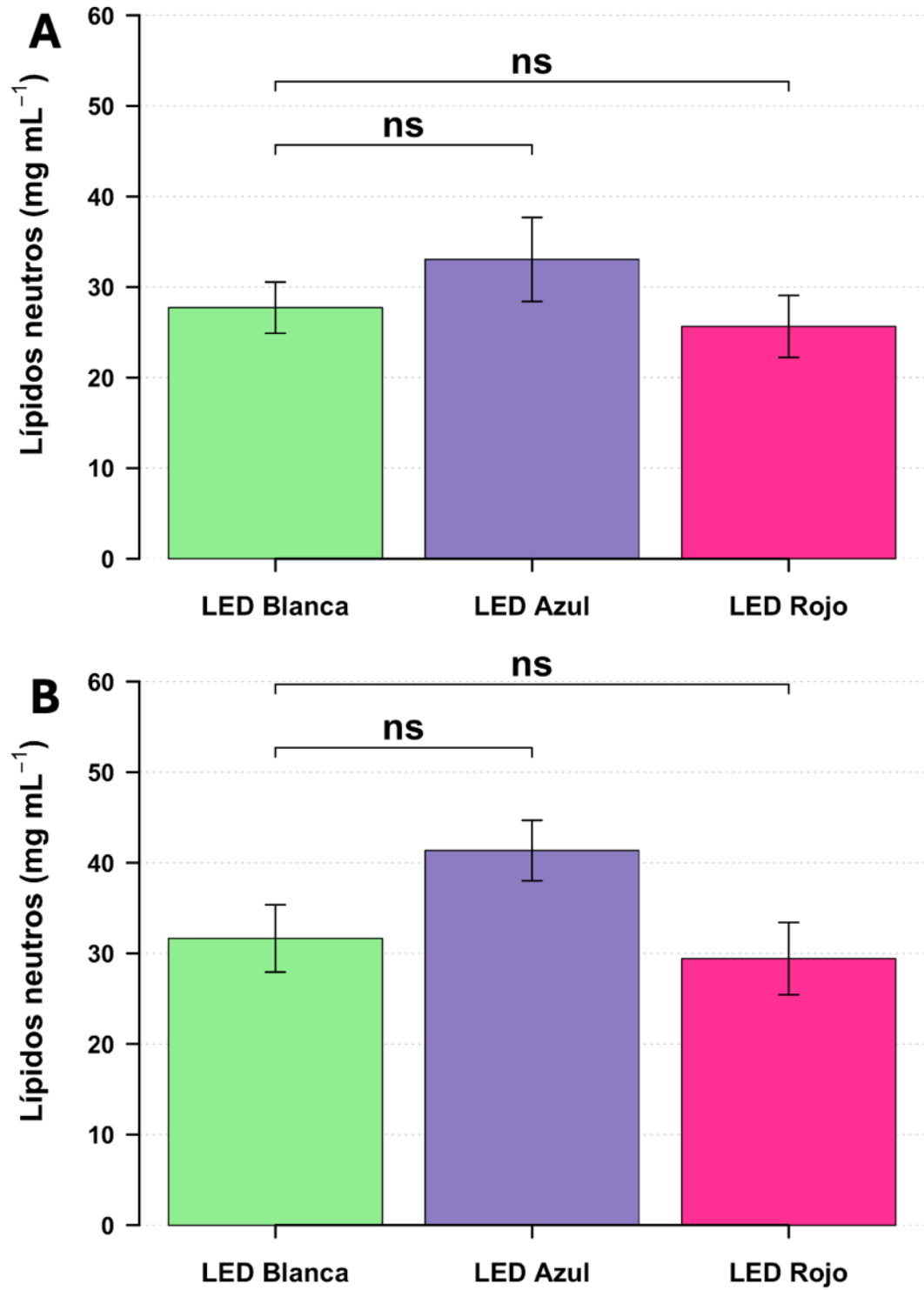


Figura 11.- a) Concentración de lípidos neutros en *C. vulgaris* y b) *S. acutus*

7.5. Extracción de lípidos totales por radiación infrarroja

Los resultados del estudio indican que la luz blanca favorece la acumulación de lípidos totales en *C. vulgaris* y *S. acutus*, con concentraciones de alrededor del 30% y 23%, respectivamente, después de 15 días de propagación. La luz LED azul no tuvo un efecto significativo en la acumulación de lípidos en ninguna de las especies, mientras que la luz LED roja resultó en una reducción de la concentración de lípidos, siendo más notable en *S. acutus* (**Figura 12**).

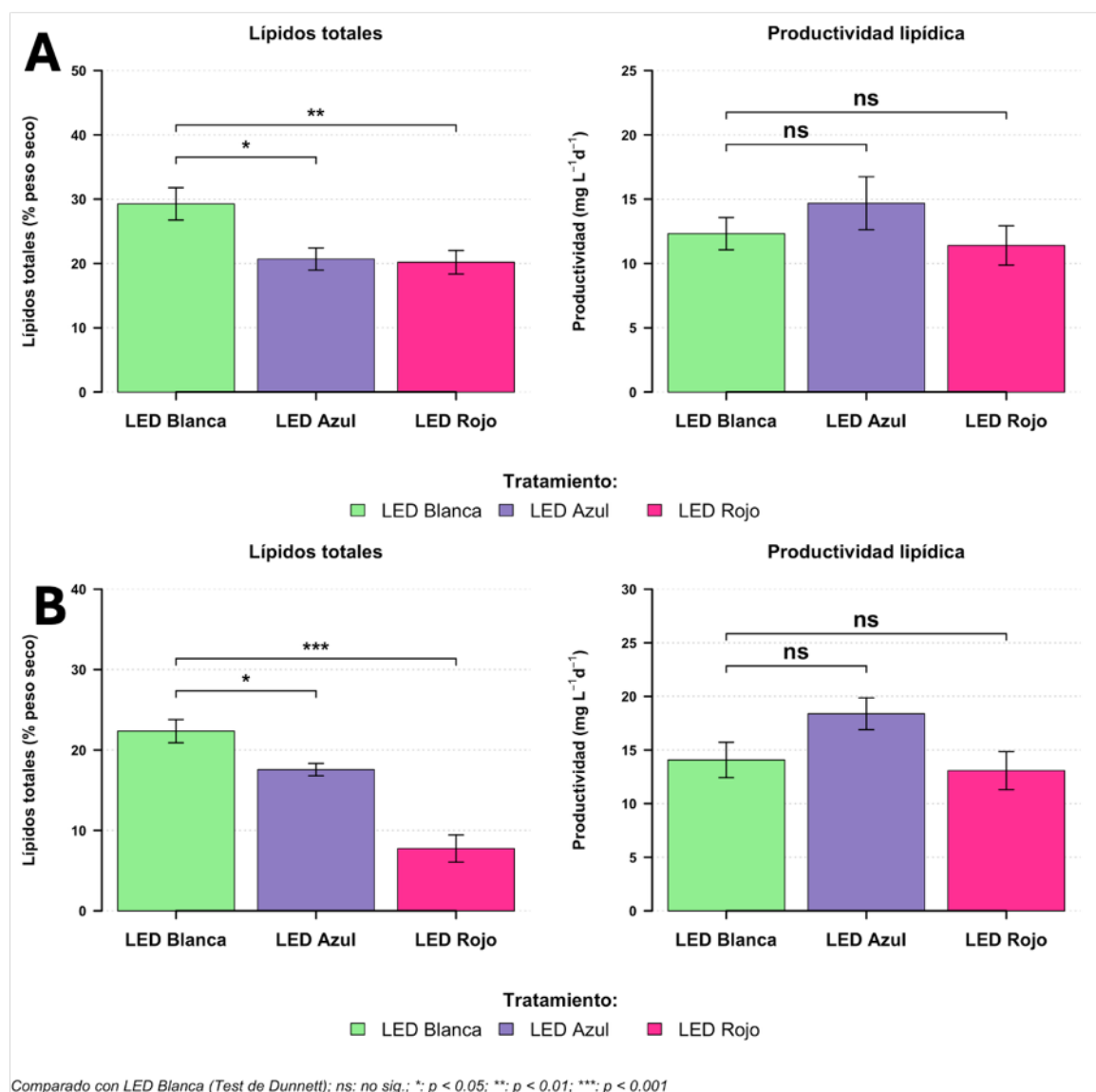


Figura 12.- a) Porcentaje de lípidos totales en *C. vulgaris* y b) *S. acutus* en luz blanca

7.6. Selección y validación de oligonucleótidos para análisis de expresión génica

Como paso previo al análisis cuantitativo, se validó un conjunto de oligonucleótidos para evaluar la expresión de genes clave en la biosíntesis de lípidos. El gen **18S** ribosomal amplificó correctamente en ambas especies, por lo que fue seleccionado como el gen constitutivo de referencia para la normalización de los datos de expresión.

Para los genes metabólicos, los resultados de la validación inicial mostraron que, de los primers diseñados específicamente para este trabajo (**Tabla 3**), solo el par correspondiente al gen **KAS** amplificó exitosamente en *C. vulgaris*. Ante este resultado, se procedió a probar un panel de oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias homólogas del alga modelo *Chlamydomonas reinhardtii*, cuya eficacia ha sido previamente reportada en la literatura para el estudio de rutas lipídicas.

Tabla 3.- a) Oligonucleótidos diseñados para *C.vulgaris* y b) *S. acutus*.

Gen	ID de referencia (NCBI)	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse	Longitud de amplicón (pb)	% GC	Tm (°C)
DGAT				196	55-55	60.03 – 60.04
SAD				137	50-55	59.83 – 60.11
KAS				120	60-50	60.03 – 59.97
Alfa-tubulina				257	55-60	59.96 – 59.97

Gen	ID de referencia (NCBI)	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse	Longitud de amplicón (pb)	% GC	Tm (°C)
SAD				83	55 -55	59.82 – 60.61
KAS 3				166	55-50	59.96 – 60.03
KAR 1				124	60-50	60.18 – 59.96
18S				122	55 - 55	60.03 – 59.96

Tras la validación mediante PCR de punto final y electroforesis en gel de agarosa, se confirmó la amplificación específica y eficiente de los siguientes genes:

- **Para *C. vulgaris*:** Se seleccionaron los genes **KAS**, **BCR** y **GPAT**.
- **Para *S. acutus*:** Se seleccionaron los genes **KAR**, **BCX1**, **KAS** y **SAD**.

Este conjunto final de oligonucleótidos validados fue el que se utilizó para llevar a cabo los análisis de cuantificación de la expresión por RT-qPCR descritos en la sección 7.8.

7.7. Obtención y análisis de ADNc

Una vez extraído el ARN total de las muestras, se evaluó su integridad y pureza. Un paso crucial antes de la síntesis de ADNc es asegurar la ausencia de ADN genómico contaminante, ya que su presencia podría generar resultados falsos positivos en los análisis de expresión posteriores.

Para verificar esto, se realizó una PCR de punto final de control directamente sobre las muestras de ARN extraído, utilizando los cebadores específicos para el gen 18S. La aparición de bandas de amplificación en esta PCR (ver Figura 16) confirmó la presencia de trazas de ADN genómico en las extracciones.

Para eliminar este contaminante, todas las muestras de ARN fueron tratadas con la enzima DNasa I (libre de ARNasa) de BioLabs®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ARN y libre de ADN genómico, se procedió a la

síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción, utilizando el kit ThermoScientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Este ADNc de alta calidad fue el material de partida para los análisis de expresión por RT-qPCR.

Como se observa en los resultados preliminares (**Figura 13**), el kit Quick-RNA™ Plant Miniprep de Zymo Research demostró un rendimiento superior, produciendo bandas de ARNr nítidas, bien definidas y con una relación estequiométrica adecuada, lo que indica una mínima degradación y una alta integridad del ARN. Esta alta calidad es un requisito indispensable para la construcción de bibliotecas de ADNc robustas y fiables para la secuenciación (RNA-Seq). En contraste, los otros kits evaluados mostraron un mayor grado de degradación o un menor rendimiento.

Basado en esta evidencia empírica, se tomó la decisión de estandarizar el protocolo utilizando el kit de Zymo Research para todas las muestras destinadas a la secuenciación masiva, asegurando así la máxima calidad de los datos transcriptómicos. Para las pruebas de validación y la evaluación de la expresión de genes específicos mediante RT-qPCR, se utilizó el kit PureLink™ RNA Mini Kit de Ambion, el cual proporcionó un material con la calidad suficiente para estas aplicaciones.

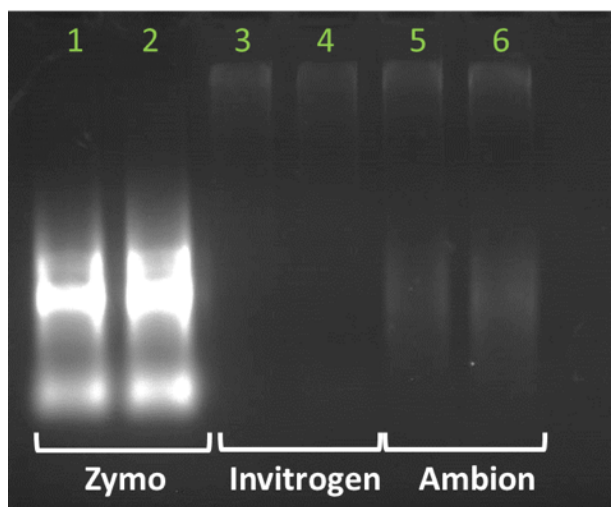


Figura 13.- ARN de *C. vulgaris* y *S. acutus* en carril 1, 3, 5 y 2, 4, 6 respectivamente.

Por consiguiente, se utilizó este kit para procesar todas las muestras de *C. vulgaris* y *S. acutus* recolectadas en los días 7, 12 y 15 bajo las tres condiciones de luz. La calidad de este conjunto de extracciones fue evaluada mediante cuantificación espectrofotométrica, donde se midió la concentración y pureza de cada muestra en un NanoDrop ND-1000, confirmando relaciones de absorbancia $A_{260}/_{280}$ y $A_{260}/_{230}$ adecuadas, y el análisis de integridad por electroforesis. Como se aprecia en la **Figura 14**, las muestras de ARN extraídas con el kit de Ambion mostraron las bandas del ARN ribosomal, indicando una integridad suficiente para proceder con la síntesis de ADNc y los análisis cuantitativos.



Figura 14.- ARN de los días 7, 12 y 15 en *C. vulgaris* y *S. acutus* en luz blanca (B), azul (A) y roja (R).

Para asegurar la calidad del material de partida para la retrotranscripción, se realizó un control para detectar la posible contaminación con ADN genómico en las muestras de ARN extraído. Para ello, se llevó a cabo una PCR de punto final utilizando el ARN total como molde y los cebadores que amplifican el gen 18S.

Como se observa en la **Figura 15**, la amplificación de bandas en estas reacciones confirmó la presencia de ADN genómico residual en las muestras de ARN. Para eliminar este contaminante, las muestras fueron tratadas con la enzima DNasa I (libre de ARNasa) de BioLabs®.

Una vez verificado que el ARN estaba libre de ADN, se prosiguió con la generación de ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción, utilizando el kit ThermoScientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). El molde para esta reacción fue el ARN purificado de cada tratamiento y día de muestreo para *C. vulgaris* y *S. acutus*.

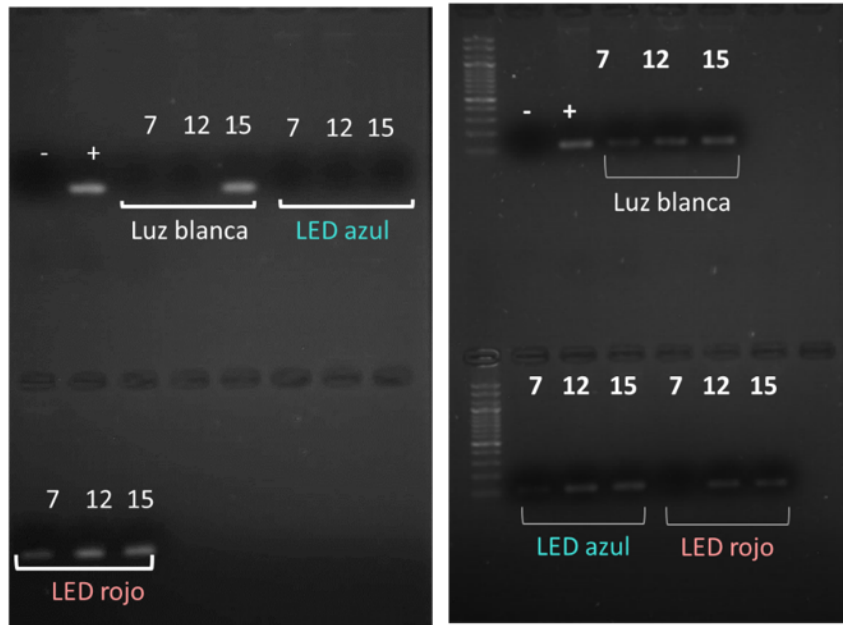


Figura 15.- PCR de ARN de *C. vulgaris* y *S. acutus* para el gen 18S en diferentes tratamientos en los días 7, 12, 15. Con blanco de reacción para 18S (-) y como positivo ADN genómico de cada microalga según corresponde (+).

Una vez generados los ADNc se cuantificaron, y se realizó una PCR con los cebadores para el 18S para evaluar su integridad y verificar que sean aptas para el análisis de expresión en PCR tiempo real. La **Figura 16** muestra este análisis.

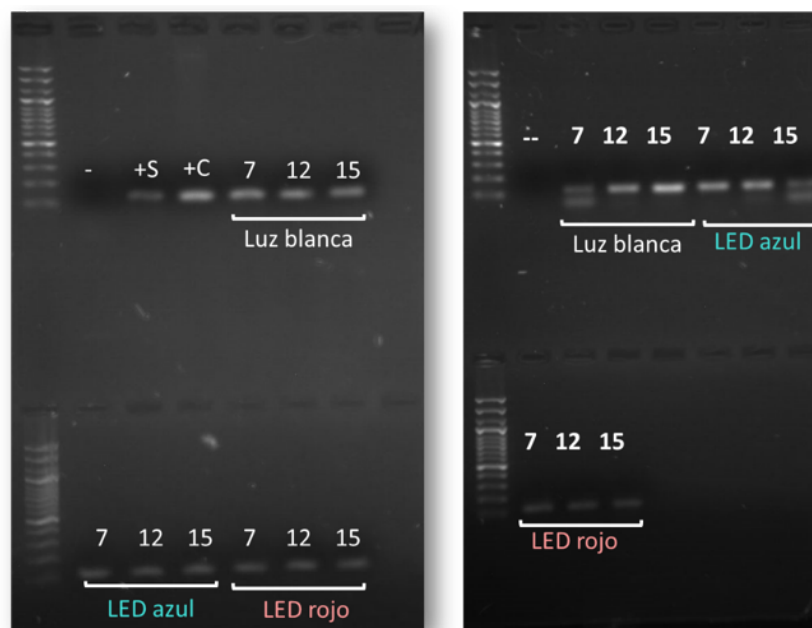


Figura 16.- PCR con ADNc de *C. vulgaris* y *S. acutus* para el gen 18S en diferentes tratamientos en los días 7, 12, 15. Con blanco de reacción para 18S (-) y como positivo ADN genómico de *S. acutus* (+S), *C. vulgaris* (+C).

7.8. Evaluación de niveles de expresión por PCR en tiempo real.

En la **Figura 17** se muestra el perfil de expresión de los genes KAS, GPAT y BCR en *C. vulgaris* bajo la influencia de luz blanca, roja y azul en los días 7, 12 y 15 (Gráfica 6 a). En el día 7, se observa una sobreexpresión significativa del gen KAS en presencia de luz roja, alcanzando un nivel cercano a 5. Sin embargo, los genes GPAT y BCR muestran niveles de expresión inferiores a 3 tanto en luz blanca como en luz azul.

En el día 12, se observa una marcada sobreexpresión de KAS, aproximadamente 30 veces mayor en luz azul y cercana a 4 en luz roja. Además, el gen BCR también presenta sobreexpresión significativa de hasta 6 veces en presencia de luz azul.

En el día 15, tanto en luz roja como en luz azul, se registra una sobreexpresión ligeramente superior a 3 para el gen BCR. Estos datos indican que el día 12 provoca una sobreexpresión de dos genes, KAS y BCR, en presencia de luz azul, mientras

que en luz roja se observa una sobreexpresión únicamente en el gen KAS. Cabe destacar que ninguno de los genes supera el nivel de expresión 2 en presencia de luz blanca.

En cambio, en el caso de *S. acutus* (**Figura 17b**), en el día 7 se observa una sobreexpresión significativa de los genes SAD y BCX1 en presencia de luz roja, superando el nivel 3. En el día 12, el gen BCX1 muestra una sobreexpresión notable en luz azul, alcanzando hasta 35 veces más de su nivel de expresión normal, seguido por una sobreexpresión de hasta 12 veces en luz roja.

En el día 15, todos los genes muestran una sobreexpresión de tres veces mayor en presencia de luz azul con respecto a la expresión en luz blanca. Entre ellos, el gen SAD presenta la mayor sobreexpresión, llegando hasta 20 veces, seguido por BCX1 con una sobreexpresión de 6 veces. Aunque los genes BCX1 y KAR muestran una sobreexpresión apenas superior al nivel 3 en presencia de luz roja, el gen SAD logra una sobreexpresión de hasta 6 veces. Por lo tanto, el día 15 se puede considerar como el día con la mayor sobreexpresión de los genes bajo la influencia de luz azul y roja.

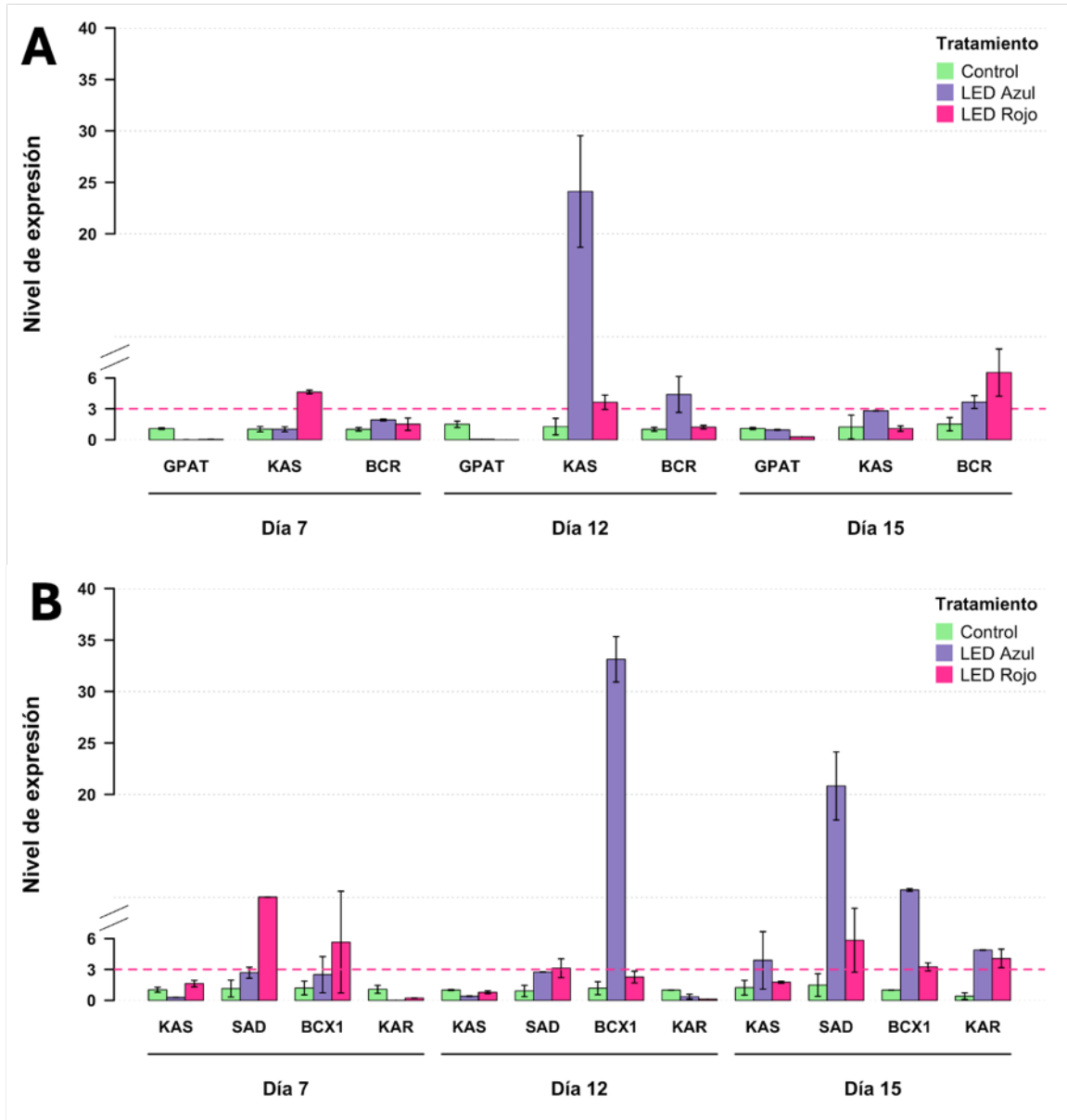


Figura 17.- a) Expresión relativa de genes en *C. vulgaris* y **b)** *S. acutus* en los días 7, 12 y 15 después de iniciada la propagación de biomasa en luz blanca, azul y roja.

7.9. Identificación y cuantificación de ácidos grasos.

La identificación de ácidos grasos se realizó utilizando un estándar comercial como referencia, y se compararon los tiempos de retención de cada pico identificado en las muestras analizadas. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de cada ácido graso identificado en cada muestra para realizar comparaciones entre las diferentes cepas y condiciones establecidas en el experimento.

Cabe destacar que se llevaron a cabo triplicados técnicos y biológicos para cada muestra, asegurando así la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Este enfoque riguroso permitió una evaluación confiable de los porcentajes de ácidos grasos presentes en cada muestra y facilitó la comparación entre las diferentes condiciones experimentales (**Figura 18**).

En el perfil de ácidos grasos de *C. vulgaris*, se observa una predominancia de ácido linolénico y ácido linoleico, que representan casi el 30% de la composición total. El ácido palmítico se encuentra cerca del 20%, seguido por el ácido butírico y el ácido oleico, que se encuentran en proporciones similares y cercanas al 10%. Por último, el ácido esteárico constituye un poco más del 5% del perfil de ácidos grasos. Se destaca que en presencia de luz azul se observa una disminución en la producción de ácido linoleico en comparación con la luz control y la luz roja, pero se observa un aumento en la producción de ácido linolénico. Los demás ácidos grasos presentan un comportamiento similar al grupo de control.

En el caso de *S. acutus*, se observa una mayor producción de ácido butírico en presencia de luz azul y luz roja en comparación con la luz control. Al igual que en *C. vulgaris*, el ácido palmítico se encuentra cerca del 20% de la composición total. Sin embargo, el ácido oleico muestra una concentración duplicada en comparación con *C. vulgaris*, aunque en presencia de luz control se triplica. Se observa que la concentración de ácido linoleico y ácido linolénico puede ser similar a la de *C. vulgaris*, pero su producción se incrementa considerablemente en presencia de luz azul y luz roja.

Estas observaciones en el perfil de ácidos grasos de *C. vulgaris* y *S. acutus* proporcionan información valiosa sobre las diferencias en la composición lipídica y la respuesta a la luz en estas microalgas. Los altos niveles de ácido linolénico y ácido linoleico en *C. vulgaris* sugieren su potencial como fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, la mayor producción de ácido butírico en *S. acutus* bajo condiciones de luz azul y roja indica una posible regulación enzimática específica en respuesta a diferentes longitudes de onda.

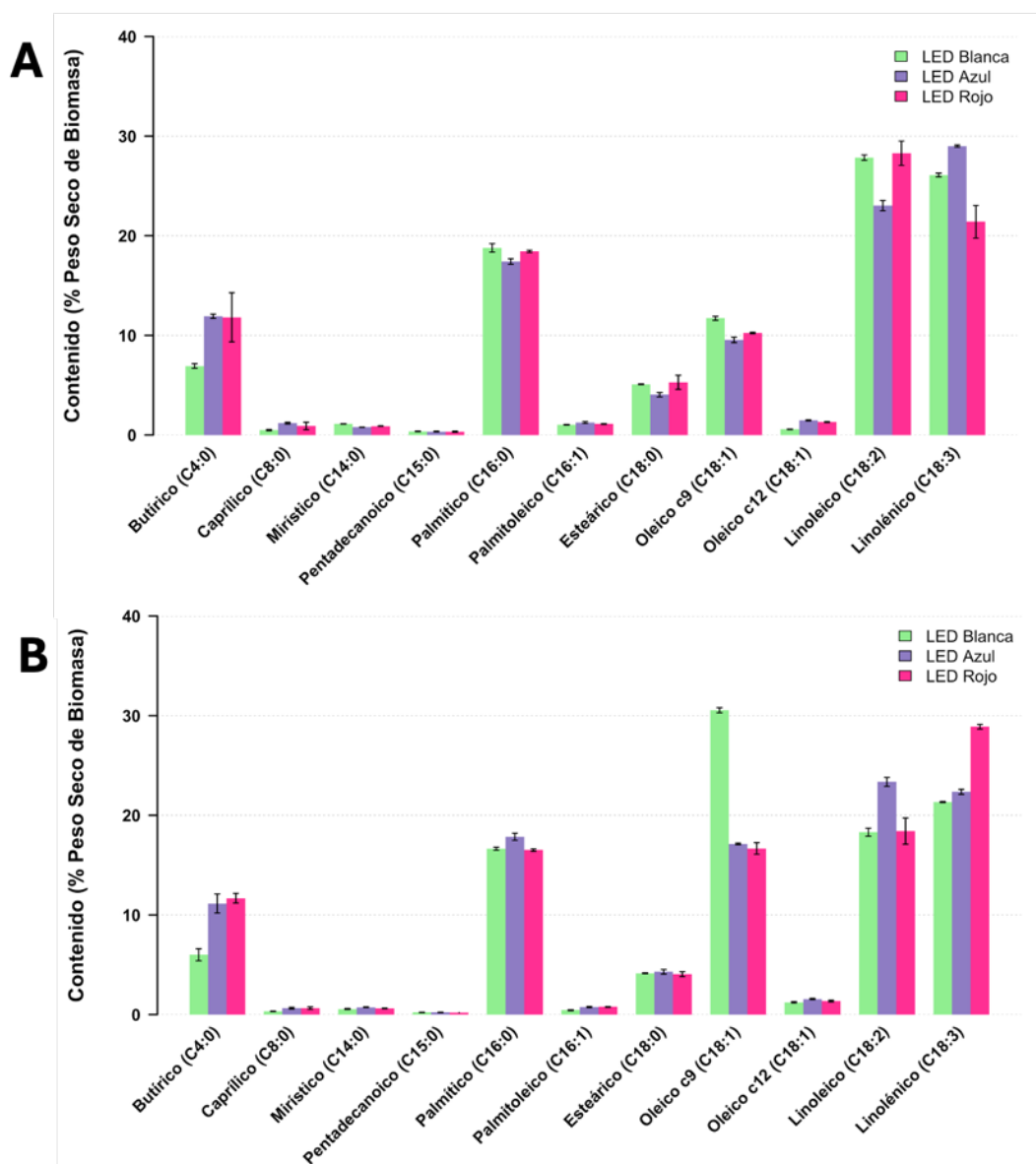


Figura 18.- a) Perfil de ácidos grasos en *C. vulgaris* y **b)** *S. acutus* al final de la cinética en luz blanca, azul y roja.

En cuanto a la concentración de ácidos grasos saturados e insaturados (**Figura 19**), en ambas microalgas, se observó una presencia de ácidos grasos insaturados superior al 60%, mientras que los ácidos grasos saturados representaron aproximadamente el 30% en las condiciones de luz control, azul y roja. En el caso de *C. vulgaris*, no se encontraron diferencias significativas en la composición de ácidos grasos entre las diferentes condiciones de luz. Sin embargo, en *S. acutus*, se observó un aumento de ácidos grasos saturados en presencia de luz roja y azul.

Estos resultados indican que ambas microalgas son ricas en ácidos grasos insaturados, lo cual es deseable desde el punto de vista bioenergético y de aplicaciones industriales. Sin embargo, es importante destacar que *S. acutus* muestra una respuesta diferencial a la luz roja y azul, con un incremento de ácidos grasos saturados en estas condiciones.

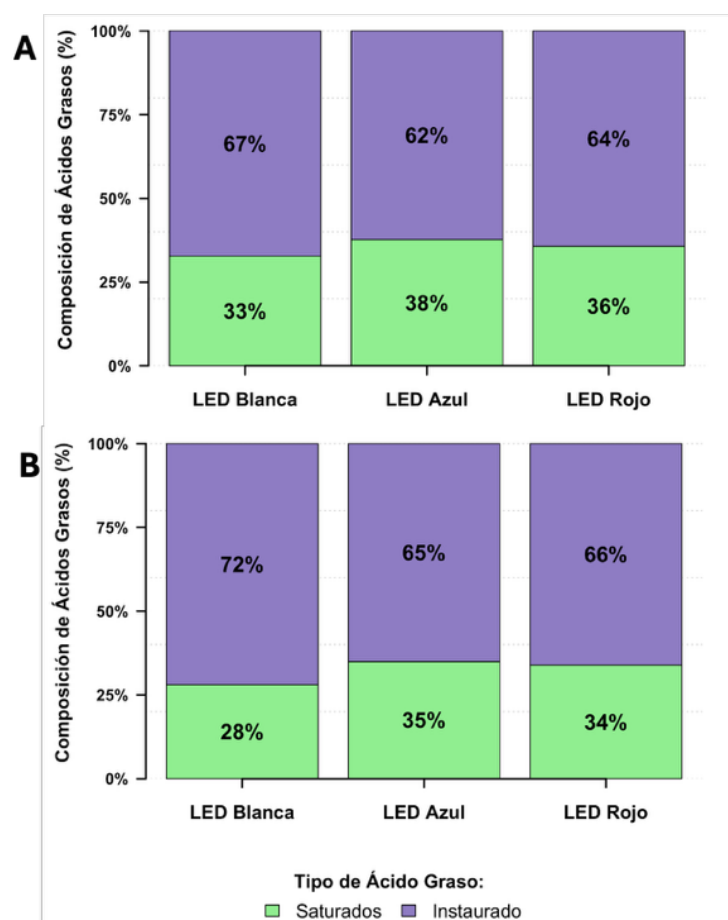


Figura 19.- a) Perfil de ácidos grasos saturados e insaturados en *C. vulgaris* y b) *S. acutus* al final de la cinética en luz blanca, azul y roja.

El análisis de los ácidos grasos insaturados (**Figura 20**) en *C. vulgaris* muestra que su composición consiste en aproximadamente un 50% de ácidos grasos poliinsaturados y más de un 15% de ácidos grasos monoinsaturados. No se observaron diferencias significativas en la proporción de estos ácidos grasos entre los tratamientos de luz roja, azul y control. Esto sugiere que la exposición a diferentes condiciones de luz no afecta significativamente el perfil de ácidos grasos insaturados en *C. vulgaris*. Por otro lado, en *S. acutus* se observó un incremento en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados, pasando del 40% al 50%, en presencia de luz azul y roja. Además, se observó una disminución de ácidos grasos monoinsaturados, reduciéndose del 33% al 20% en las mismas condiciones de luz en comparación con la luz control.

Estos resultados indican que *S. acutus* es más sensible a la variación de la luz, mostrando cambios significativos en la composición de ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados en respuesta a la luz azul y roja.

Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes para la producción y calidad de lípidos en *S. acutus*, y sugieren que la manipulación de la luz puede ser utilizada como una estrategia para modular la composición de ácidos grasos en esta especie de microalga.

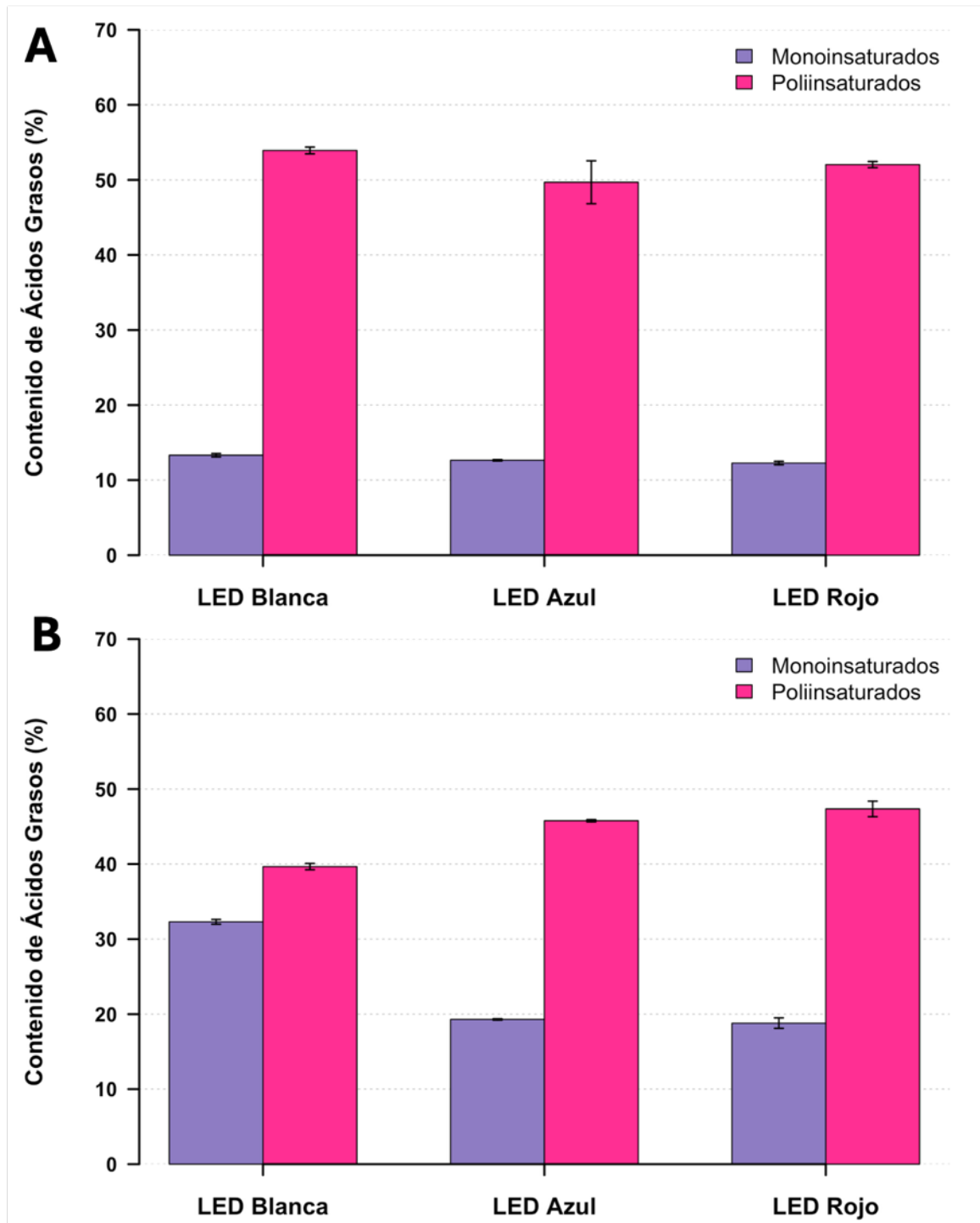


Figura 20.- a) Perfil de ácidos grasos insaturados en *C. vulgaris* y **b)** *S. acutus* al final de la cinética en luz blanca, azul y roja.

7.10. Estimación del número de cetano

A partir de los perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), determinados mediante cromatografía de gases, se procedió a la estimación del número de cetano del biodiésel que se obtuvo de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*. El cálculo se realizó aplicando el modelo de regresión lineal múltiple validado por Sánchez-Borrotto et al. (2012), que correlaciona la composición de FAMES con la calidad de ignición del combustible. Los valores estimados para cada especie bajo las diferentes condiciones de cultivo lumínico fueron los siguientes: para *Chlorella vulgaris*, el NC fue de 46.76 bajo luz blanca (control), 43.24 bajo luz azul y 44.89 bajo luz roja. En el caso de *Scenedesmus acutus*, los valores correspondientes fueron de 49.17 (control), 45.56 (luz azul) y 44.14 (luz roja).

El cumplimiento de los valores de NC estimados para cada muestra frente a estas normativas se resume en la **Tabla 4**.

Tabla 4.- Cumplimiento normativo del número de cetano para el biodiésel de microalgas.

Especie	Condición de Luz	NC Estimado	Cumple ASTM D975 (>40) (Diésel de uso general, EE. UU.)	Cumple NOM-EM-005-CRE-2015 (>45) (Diésel automotriz, México)	Cumple ASTM D6751 (>47) (B100 para mezcla, EE. UU.)	Cumple EN 14214 (>51) (B100, Europa)
<i>C. vulgaris</i>	Luz Blanca	46.76	Sí	Sí	No	No
	LED Azul	43.24	Sí	No	No	No
	LED Roja	44.89	Sí	No	No	No
<i>S. acutus</i>	Luz Blanca	49.17	Sí	Sí	Sí	No
	LED Azul	45.56	Sí	Sí	No	No
	LED Roja	44.14	Sí	No	No	No

El análisis comparativo revela que la totalidad de los biodiésel producidos a partir de ambas microalgas y bajo todas las condiciones lumínicas cumplen con el requisito mínimo de la norma ASTM D975, lo que los califica para ser utilizados en mezclas de bajo porcentaje en el mercado estadounidense. Sin embargo, se observa una clara diferenciación en los niveles de calidad superiores. El biodiésel derivado de *S. acutus* cultivado bajo luz blanca de control es el único que satisface

los criterios de la norma ASTM D6751, con un NC de 49.17, posicionándolo como una mezcla B100 de alta calidad apto para el mercado de América del Norte. Los biodiésel de *C. vulgaris* (control) y *S. acutus* (luz azul) también cumplen con la normativa mexicana NOM-EM-005-CRE-2015. Es importante destacar que ninguna de las condiciones experimentales evaluadas en este estudio produjo un biodiésel capaz de cumplir con la exigente norma europea EN 14214, que demanda un NC superior a 51.

7.11. Análisis bioinformáticos

Una vez obtenidas las lecturas crudas de la secuenciación de ARN (RNA-Seq), fue indispensable la implementación de un flujo de trabajo bioinformático. Este proceso es fundamental para transformar los datos masivos en información biológicamente coherente y fiable. En esta sección se detalla el análisis computacional realizado, desde el control de calidad inicial de las secuencias y el ensamblaje *de novo* de los transcriptomas, hasta la anotación funcional de los genes y la cuantificación de su expresión.

7.11.1. Control de calidad y estabilización de la varianza de los datos de expresión transcriptómica

Previos al análisis de expresión génica diferencial, se realizó un control de calidad de los datos de conteo crudos para evaluar la relación media-varianza, un fenómeno inherente a los datos de secuenciación de ARN que puede sesgar los análisis estadísticos posteriores.

La **Figura 21** muestra la relación entre la media de expresión (en escala $\log_2$) y la varianza (representada como desviación estándar) para los datos normalizados por el método convencional. Se observa una tendencia clara en la que la varianza de los conteos génicos aumenta proporcionalmente con el nivel de expresión media. Este patrón, conocido como dependencia de la media de la varianza (mean-variance dependence), confirma la necesidad de aplicar métodos de transformación de datos

que estabilicen la varianza a lo largo de todo el rango de expresión para cumplir con los supuestos de los modelos estadísticos que se utilizarán en la identificación de genes diferencialmente expresados.

Para corregir este efecto, se aplicó una transformación de los datos utilizando el método `rlog` (regularized logarithm). Esta transformación logró estabilizar eficazmente la varianza en casi todo el rango de expresión. Tras la transformación, la desviación estándar se mantuvo constante (aproximadamente entre 0 y 4) para la gran mayoría de los genes, independientemente de su nivel de expresión media (que abarcó desde aproximadamente 5 hasta 20 unidades en $\log_2$). Este resultado demuestra que la transformación `rlog` fue exitosa en homogeneizar la varianza, eliminando la dependencia observada en los datos crudos y permitiendo así la aplicación robusta y confiable de análisis estadísticos downstream, como las pruebas para expresión diferencial.

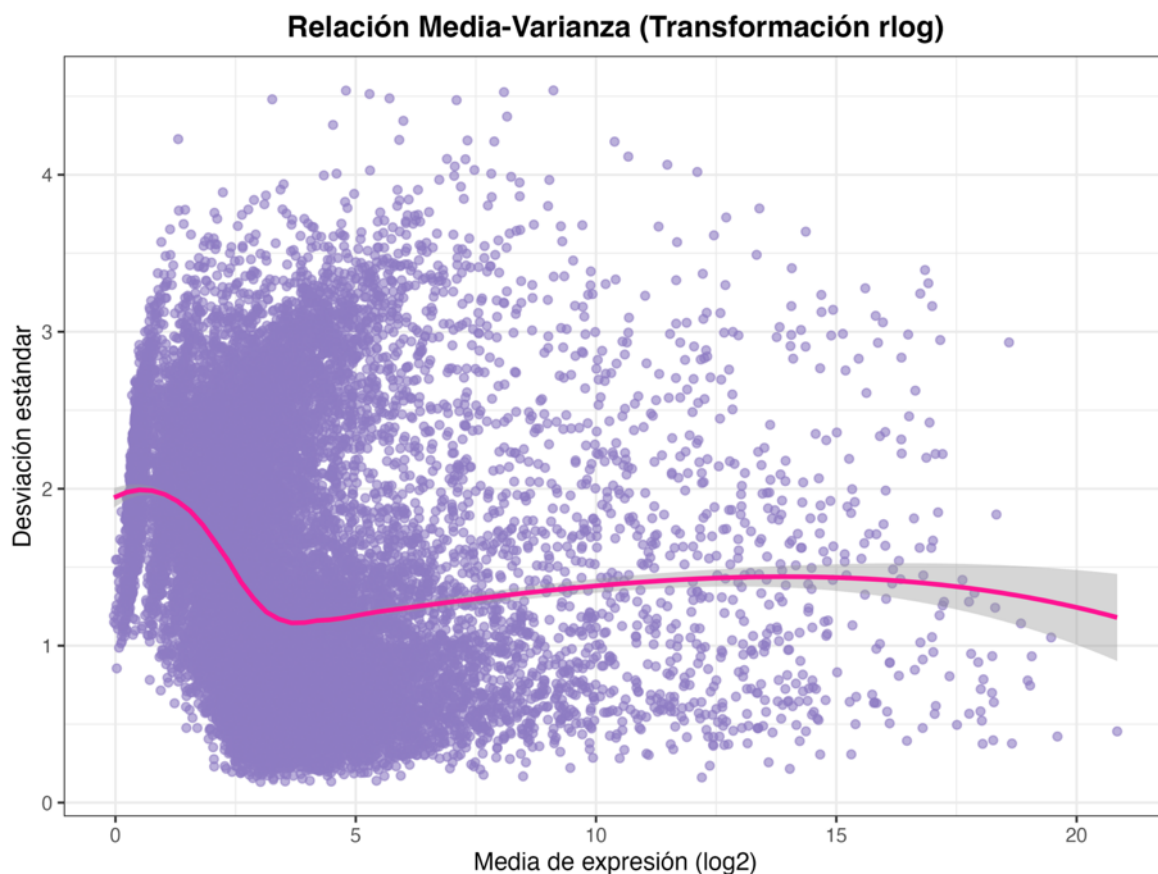


Figura 21.- Relación media-varianza después de la transformación estabilizadora de varianza (rlog). La transformación logró homogenizar la varianza a lo largo de todo el rango de expresión, cumpliendo con los supuestos para los análisis estadísticos posteriores.

Este paso de preprocesamiento y control de calidad es fundamental para minimizar falsos positivos y garantizar que los resultados posteriores de expresión génica diferencial reflejen verdaderas alteraciones biológicas y no artefactos técnicos o estadísticos de los datos de secuenciación.

7.11.2. Evaluación de la influencia de muestras en el modelo mediante distancias de Cook

Para identificar posibles valores atípicos (outliers) o muestras con una influencia desproporcionada en el modelo estadístico utilizado para el análisis de expresión diferencial, se calcularon las distancias de Cook. Esta métrica evalúa cuánto cambiarían las estimaciones de los coeficientes del modelo (en este caso, los

asociados a los diferentes tratamientos de luz) si se excluyera una muestra particular. Un valor alto de distancia de Cook indica que una sola muestra tiene un peso excesivo en las conclusiones del modelo, lo que podría sesgar los resultados.

El análisis, representado en un diagrama de caja y bigotes (**Figura 22**), muestra la distribución de los valores de $\log_{10}$ (distancia de Cook) para todas las réplicas biológicas de cada condición: control (luz blanca) y los tratamientos con luz azul y luz roja.

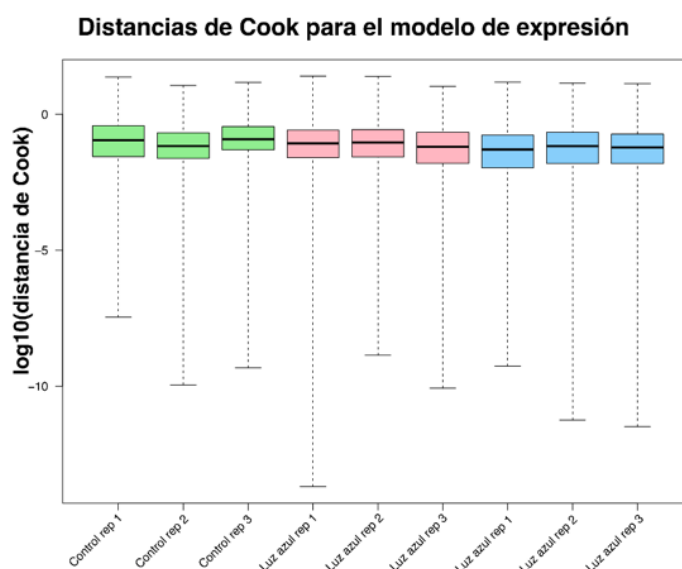


Figura 22.- Distribución de las distancias de Cook para el modelo de expresión diferencial. La ausencia de valores atípicos extremos indica que ninguna muestra individual ejerció una influencia desproporcionada en el modelo, confirmando su robustez.

Se observa que la gran mayoría de las distancias de Cook para todas las muestras se agrupan en un rango bajo y consistente (valores de $\log_{10}$ próximos a 0). La distribución es homogénea entre las réplicas de cada condición y entre las diferentes condiciones experimentales. No se detectaron valores atípicos extremos, lo que indica que ninguna réplica individual ejerció una influencia desproporcionada o anómala en el modelo de expresión génica.

Este resultado confirma la robustez y confiabilidad del modelo estadístico empleado, ya que las inferencias sobre la expresión génica diferencial no están dominadas o sesgadas por una o unas pocas observaciones extremas. La consistencia entre

réplicas biológicas dentro de cada tratamiento valida la calidad de los datos y la correcta ejecución del experimento, permitiendo proceder con confianza a la identificación de genes diferencialmente expresados.

7.11.3. Análisis de similitud global entre muestras mediante heatmap de distancias

Se realizó un análisis de agrupamiento basado en distancias euclidianas de los perfiles de expresión transformados con transformación estabilizadora de la varianza para evaluar la similitud transcripcional global entre las muestras y confirmar la consistencia de las réplicas biológicas en cada condición experimental. El heatmap de distancias obtenido representa la matriz de distancias entre todos los pares de muestras analizadas (**Figura 23**). Los tonos más oscuros indican mayor similitud entre muestras, mientras que los tonos más claros reflejan mayor disimilitud. En este gráfico, un color más oscuro (valores más bajos en la escala, ej. 0-100) indica una mayor similitud (menor distancia) entre los perfiles de expresión de dos muestras, mientras que un color más claro (valores más altos, ej. 300-400) indica una mayor disimilitud.

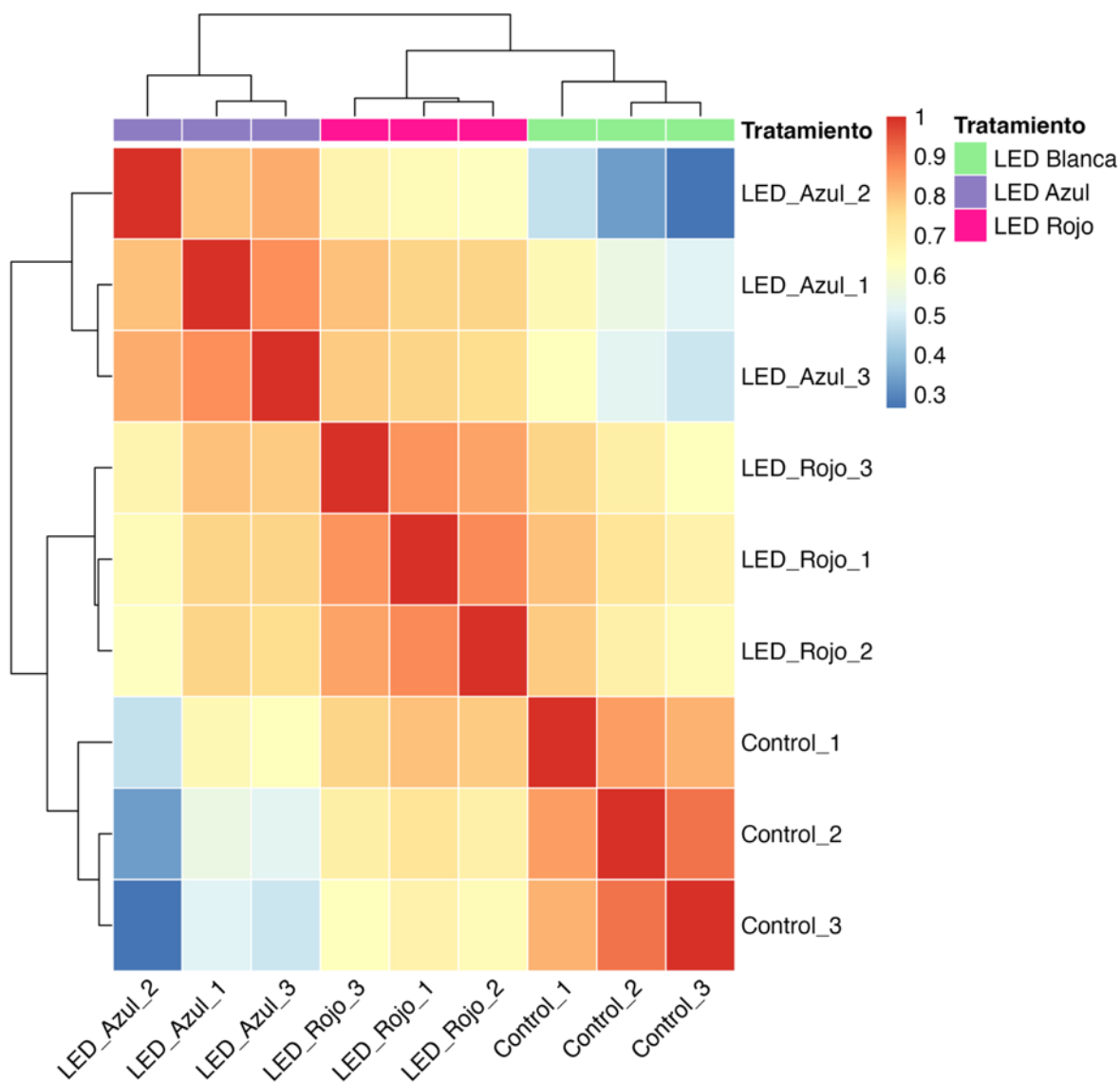


Figura 23.- Heatmap de distancias entre muestras (transformación VST). La agrupación compacta de réplicas biológicas dentro de cada tratamiento (bloques diagonales oscuros) y la mayor distancia entre tratamientos diferentes validan la consistencia experimental y el fuerte efecto del factor lumínico.

Se observa un patrón de agrupamiento claro y consistente, las réplicas biológicas de un mismo tratamiento (por ejemplo, Control rep1, rep2, rep3) muestran distancias muy bajas entre sí, como lo indica el color oscuro en los bloques de la diagonal correspondientes a cada grupo. Esto demuestra una alta concordancia y repetibilidad técnica y biológica dentro de cada condición experimental.

Los perfiles de expresión de los diferentes tratamientos (Control, Luz Azul, Luz Roja) son claramente distinguibles. Esto se evidencia por los cuadrados de color más claro (mayores valores de distancia) en las intersecciones entre los distintos grupos de tratamiento. Este patrón confirma que el factor experimental principal (la longitud de onda de la luz) induce cambios globales y reproducibles en el transcriptoma de ambas microalgas.

Este análisis proporciona una validación robusta de la calidad del experimento, confirmando que la señal biológica asociada a cada tratamiento es fuerte y consistente, y es mucho mayor que la variabilidad inherente entre las réplicas. Por lo tanto, los cambios transcriptómicos observados posteriormente pueden atribuirse con confianza al efecto de los diferentes tratamientos de luz.

7.11.4. Análisis de correlación entre muestras mediante heatmap de coeficientes de correlación

Se calculó la matriz de coeficientes de correlación de Pearson a partir de los datos transformados con rlog para obtener una medida cuantitativa de la similitud entre los perfiles de expresión globales.

La matriz se muestra de forma gráfica en el heatmap de correlaciones correspondiente (**Figura 24**). Los tonos azul intensos corresponden a valores de correlación cercanos a 1, indicando alta similitud en el perfil transcripcional entre muestras. Los colores azules o claros reflejan valores de correlación bajos, indicando baja similitud o ausencia de correlación. Por el contrario, los colores oscuros reflejan valores de correlación altos.

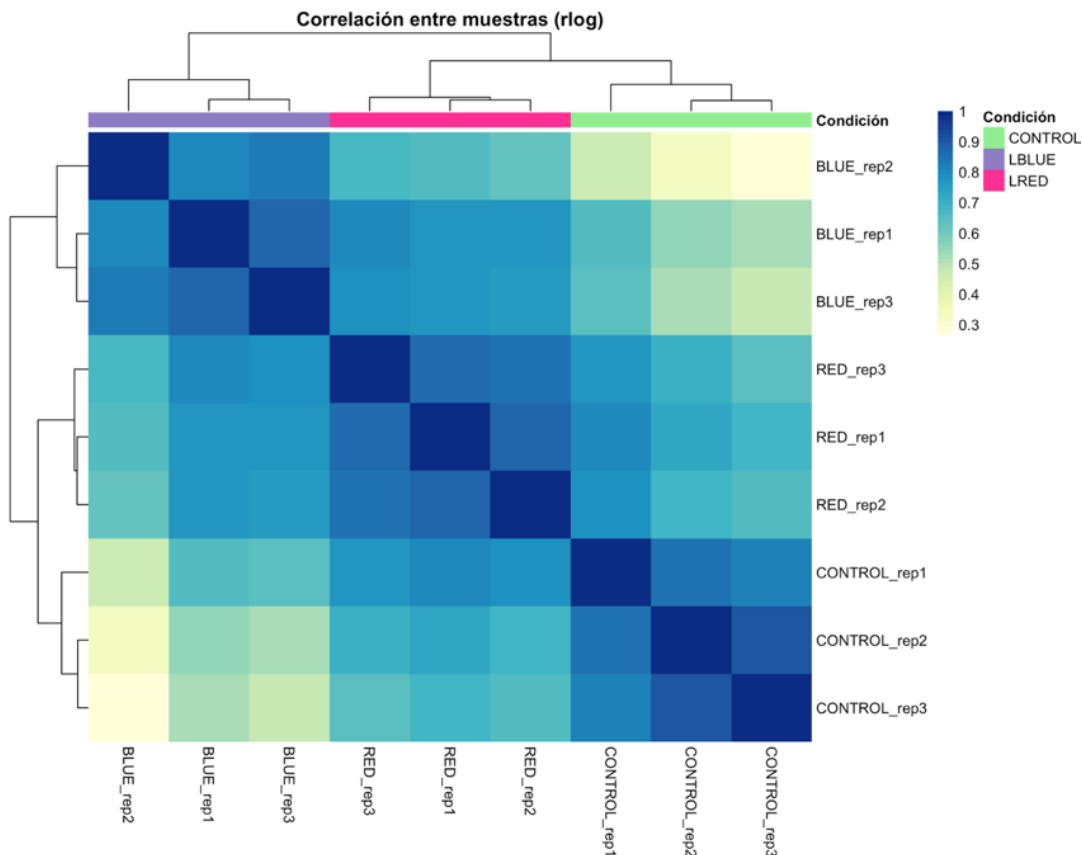


Figura 24.- Heatmap de coeficientes de correlación de Pearson entre muestras (transformación rlog). Los altos valores de correlación (azul intenso) dentro de cada grupo de tratamiento (>0.9) y los valores menores entre grupos confirman la

repetibilidad y la solidez de la respuesta transcriptómica específica para cada condición de luz.

Los resultados revelan un patrón de agrupamiento muy definido, se observan bloques diagonales de color azul intenso (valores de correlación superiores a 0.9) que corresponden a las comparaciones entre las réplicas biológicas de un mismo tratamiento. Esto confirma una elevada concordancia y reproducibilidad dentro de cada grupo experimental (Control, Luz Azul, Luz Roja).

Las correlaciones entre tratamientos diferentes son notablemente menores, como lo indican los colores anaranjados y amarillos (valores en el rango de ~0.6 a 0.8). Esto demuestra que cada tratamiento de luz induce un perfil de expresión transcriptómica global único y distintivo.

Se observa que la intensidad del color y, en consecuencia, el valor del coeficiente de correlación es notablemente más alta dentro de cada grupo de tratamiento que entre grupos distintos. Esto confirma que la variabilidad asociada a la condición experimental (luz blanca, azul o roja) es significativamente mayor que la derivada de variabilidad biológica o técnica no controlada.

Este resultado corrobora cuantitativamente lo observado en el análisis de distancias, reafirmando la solidez de los agrupamientos por tratamiento y la confiabilidad de los datos para realizar los análisis de expresión diferencial. La elevada correlación dentro de cada grupo garantiza que los cambios de expresión identificados sean consistentes y puedan atribuirse específicamente al efecto de la longitud de onda de la luz aplicada.

7.11.5. Visualización de la estructura global de los datos mediante análisis de componentes principales (PCA)

Con el objetivo de visualizar la estructura global de los datos de expresión y identificar las principales fuentes de variación entre las muestras, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando los perfiles de expresión transformados mediante el método rlog.

En el gráfico de PCA resultante (**Figura 25**), las muestras se proyectan en un plano bidimensional definido por los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), los cuales capturan la mayor proporción de la varianza total presente en el conjunto de datos.

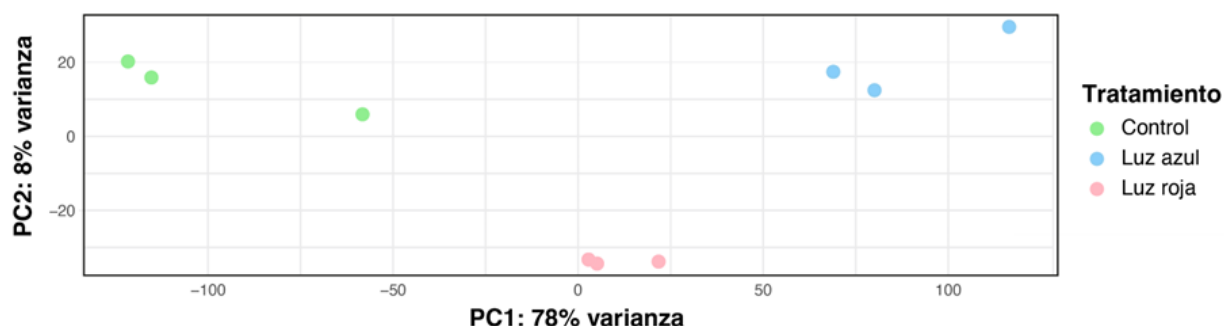


Figura 25.- Análisis de Componentes Principales (PCA) de los perfiles de expresión transcriptómica. La clara separación de los tratamientos a lo largo del PC1 (83% de varianza) demuestra que la longitud de onda de la luz es el principal factor driving que reorganiza globalmente el transcriptoma.

Los resultados son contundentes, el primer componente principal (PC1) explica por sí solo el 83% de la varianza total de los datos. Este alto porcentaje indica que la mayor fuente de variabilidad en el transcriptoma está directamente asociada a los diferentes tratamientos de luz aplicados.

El segundo componente principal (PC2) explica una proporción menor de la varianza (6%), que probablemente representa variabilidad biológica o técnica menor no asociada al factor experimental principal.

La disposición de las muestras en el gráfico muestra una separación clara y evidente entre los tres grupos de tratamiento (Control, Luz Azul y Luz Roja). Las réplicas

biológicas de un mismo tratamiento se agrupan estrechamente entre sí, formando clusters compactos y bien definidos. Esta agrupación confirma la alta reproducibilidad del experimento.

La segregación clara de las muestras a lo largo del PC1 demuestra que la longitud de onda de la luz ya sea blanca, azul o roja es el factor que mayor influencia ejerce sobre el perfil de expresión génica global en ambas microalgas, induciendo una reorganización masiva del transcriptoma. Este hallazgo valida experimentalmente la hipótesis central del estudio, confirmando que los tratamientos lumínicos no solo alteran respuestas aisladas, sino que activan programas transcriptómicos completos, distintivos y altamente consistentes. Así, se establece una base sólida para interpretar los resultados de expresión diferencial en el contexto de la modulación lumínica aplicada.

7.12. Identificación de genes diferencialmente expresados en respuesta a diferentes longitudes de onda

Se realizaron análisis de expresión génica diferencial a partir de unos 300,000 transcritos obtenidos por ensamblado *de novo*. Se seleccionó un subconjunto de ~22,000 transcritos anotados con potencial relevancia biológica tras aplicar filtros de calidad y anotación funcional. Estos transcritos constituyeron el conjunto de trabajo para los análisis subsiguientes.

Se identificaron genes diferencialmente expresados utilizando el paquete DESeq2 para todas las comparaciones entre condiciones experimentales. Control vs Luz Azul, Control vs Luz Roja, y Luz Azul vs Luz Roja. Se establecieron umbrales estadísticos estrictos para garantizar la robustez de los resultados: $|\log_2(\text{Fold Change})| > 2$ y $\text{padj} < 0.05$.

7.12.1. Análisis global y gráficos de volcán

Los gráficos de volcán (Figura 26, 27 y 28) proveen una representación visual integral de los resultados para cada comparación. En estos gráficos, cada punto representa un transcrito, graficado en función de su cambio fold ($\log_2$ Fold Change, eje X) y su significancia estadística ($-\log_{10}$ del valor p ajustado, eje Y). Los transcritos que se ubicaron en las regiones superiores laterales de los gráficos (fuera de los umbrales definidos por las líneas punteadas) fueron considerados como DEGs.

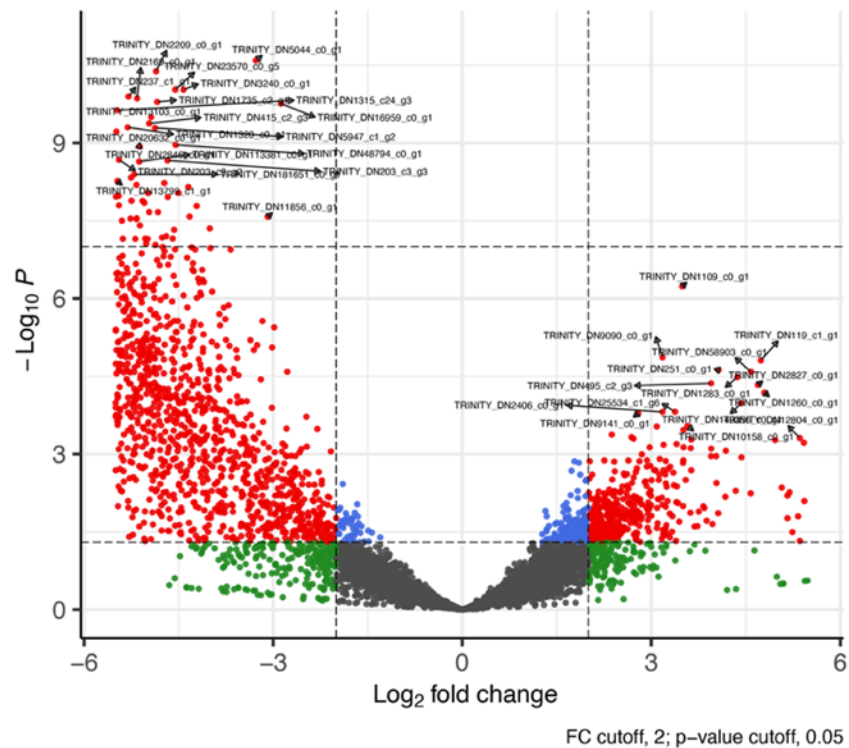
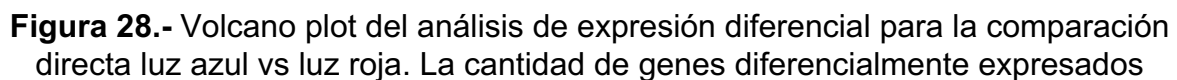
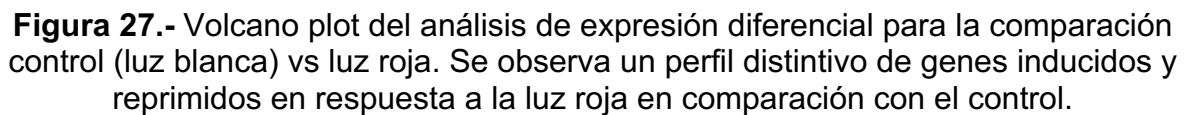


Figura 26.- Volcano plot del análisis de expresión diferencial para la comparación control (luz blanca) vs luz azul. Los puntos que superan los umbrales de $|\log_2 FC| > 2$ y $p_{adj} < 0.05$ (esquinas superiores) representan genes diferencialmente expresados significativos.



confirma que cada longitud de onda activa programas genéticos únicos y específicos.

Un examen visual de los volcanes revela que, para todas las comparaciones, un número sustancial de transcritos superó los umbrales de significancia, congregándose en las regiones laterales superiores de las gráficas. Esto indica una respuesta transcriptómica masiva y robusta tanto a la luz azul como a la roja en comparación con el control de luz blanca, así como entre ellas mismas. La nube de puntos distribuida a lo largo del eje de fold change confirma que los tratamientos lumínicos no solo activaron sino también reprimieron pathways metabólicos clave de manera significativa.

El alto número de DEGs identificados en cada contraste corrobora de manera contundente los hallazgos previos del análisis de PCA, donde la condición experimental (luz) explicaba la mayor fuente de varianza. La magnitud de los cambios observados (alto $|\log_2FC|$) y su significancia estadística (alto $-\log_{10} padj$) para cientos de transcritos confirman que el cambio en la calidad de la luz es un factor crucial que reorganiza profundamente el transcriptoma de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus*, modulando conjuntos de genes en parte solapados y en parte únicos para cada longitud de onda.

Este perfil global de expresión sienta las bases para los análisis funcionales subsiguientes, dirigidos a elucidar las vías metabólicas específicas y los mecanismos regulatorios asociados a la acumulación de lípidos inducida por la fotoestimulación.

Para complementar el análisis global de los gráficos de volcán y verificar visualmente los resultados de DESeq2, se inspeccionaron las cuentas normalizadas de genes individuales identificados como diferencialmente expresados.

La **Figura 29** muestra el perfil de expresión del transcrito en las tres condiciones experimentales (Control, Luz Azul y Luz Roja). La gráfica de barras representa los conteos normalizados (provenientes de la transformación estabilizadora de varianza de DESeq2) para cada réplica biológica dentro de un

Box plot showing the distribution of normalized counts (Conteos normalizados) for three treatments: Control, Luz azul, and Luz roja. The y-axis ranges from 0 to 200. The Control group (green) shows very low normalized counts, with a median near 0. The Luz azul group (blue) shows significantly higher normalized counts, with a median around 105. The Luz roja group (pink) shows intermediate normalized counts, with a median around 10. Individual data points are overlaid on the box plots.

Tratamiento	Conteos normalizados (aproximados)
Control	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0
Luz azul	10, 30, 105, 125, 195
Luz roja	0, 0, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10, 10

En este ejemplo representativo, se observa claramente que la expresión de este gen es sustancialmente mayor en las condiciones de Luz Azul y Luz Roja en comparación con la condición Control (Luz Blanca). Además, la consistencia entre las réplicas biológicas dentro de cada tratamiento (baja dispersión de las barras) confirma que la diferencia en la expresión es robusta y reproducible, y no un artefacto derivado de la variabilidad experimental.

69

adicional para los resultados bioinformáticos antes de proceder con el análisis de enriquecimiento funcional.

7.13. Análisis de enriquecimiento funcional de gene ontology (GO)

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional utilizando las categorías de Gene Ontology para interpretar biológicamente los conjuntos de genes diferencialmente expresados identificados en cada comparación. El análisis identifica procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares sobrerrepresentados entre los DEGs, ofreciendo una visión mecanística de la respuesta celular a los tratamientos de luz.

7.13.1. Procesos biológicos (Biological Processes - BP)

Los DEGs inducidos por la luz azul están significativamente enriquecidos en procesos relacionados con la obtención y conversión de energía, como la fase fotoquímica de la fotosíntesis (**Figura 30**). Se observó un fuerte enriquecimiento en procesos de transporte, específicamente de aminoácidos y de iones monoatómicos. Esto sugiere una reorganización del transporte de nutrientes y metabolitos. La luz azul podría estar desencadenando una amplia reprogramación transcripcional, como se evidencia en un enriquecimiento significativo en procesos relacionados con

la expresión génica, como la iniciación de la transcripción dependiente de ADN molde y la replicación del ADN.

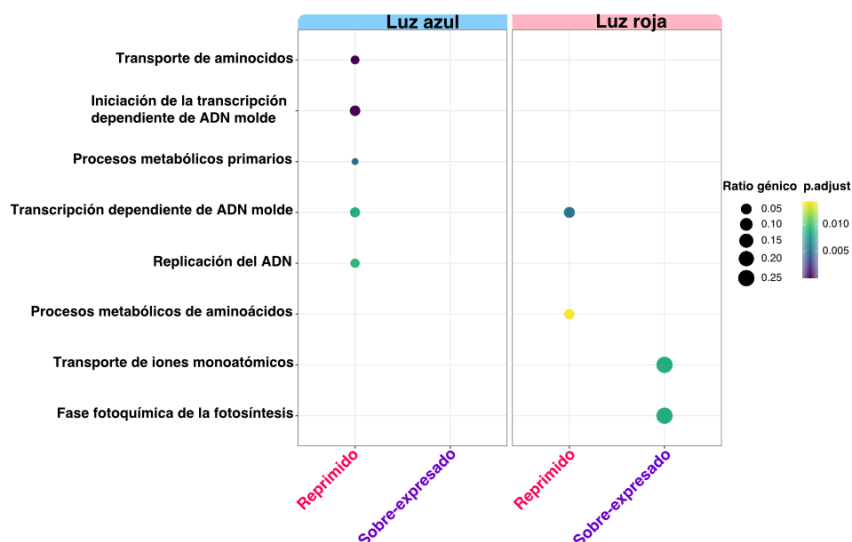


Figura 30.-Análisis de enriquecimiento funcional de Gene Ontology (GO) para procesos biológicos (BP). Se muestran los términos más enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados en los tratamientos de luz azul y roja. El tamaño del punto representa el r epresenta el ratio génico y el color representa el valor de p ajustado.

Los DEGs modulados por la luz roja mostraron un patrón de enriquecimiento en procesos biológicos similar pero distintivo, involucrando procesos metabólicos primarios y de transcripción.

7.13.2. Funciones moleculares (Molecular Functions - MF)

El análisis de enriquecimiento funcional proporcionó una resolución más fina de los mecanismos de los productos génicos (**Figura 31**). Las funciones moleculares más enriquecidas entre los DEGs bajo luz azul estuvieron vinculadas a la captación y conversión de energía lumínica, y a la transducción de señales.

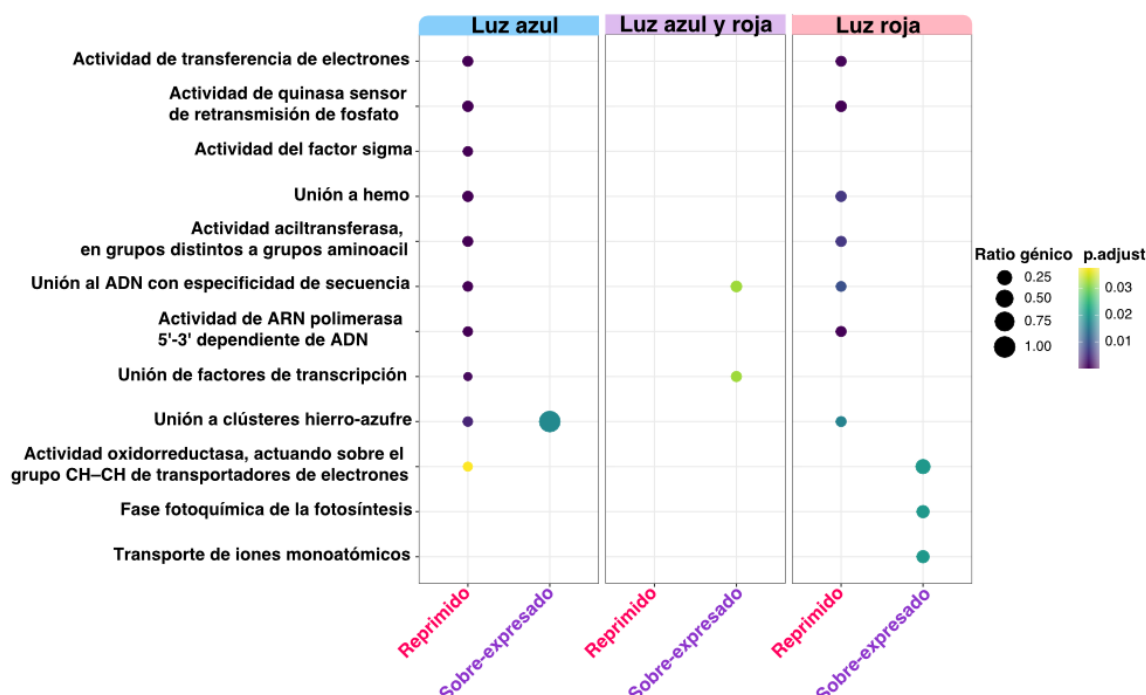


Figura 31.- Análisis de enriquecimiento funcional de funciones moleculares (MF) de Gene Ontology (GO). Se revelaron los mecanismos moleculares detrás de la respuesta, con términos relacionados con la transferencia de electrones, unión a cofactores, actividad catalítica y unión a DNA altamente enriquecidos.

Estas incluyeron:

- Actividad de transferencia de electrones
- Actividad oxidoreductasa (actuando sobre grupos CH-CH de transportadores de electrones)
- Unión a clústeres [4Fe-4S] y unión a hemo (componentes clave de cadenas de transporte de electrones).
- Actividad de quinasa sensor de retransmisión de fosfato, lo que apunta a la activación de rutas de señalización y fosforilación.

De manera crucial, se observó un fuerte enriquecimiento en funciones relacionadas con la regulación de la transcripción, como:

- Actividad del factor sigma
- Unión al ADN con especificidad de secuencia
- Unión de factores de transcripción

- Actividad de ARN polimerasa ADN-dependiente 5'->3'.

Este hallazgo corrobora y da mecanismo a los procesos biológicos identificados, confirmando que la luz azul induce una masiva reprogramación del transcriptoma a través de la modulación de la maquinaria transcripcional central.

7.13.3. Visión integrada de la respuesta a la luz LED

El análisis GO general (**Figura 32**) consolida estos hallazgos, mostrando un solapamiento y una especificidad entre las respuestas a la luz azul y roja.

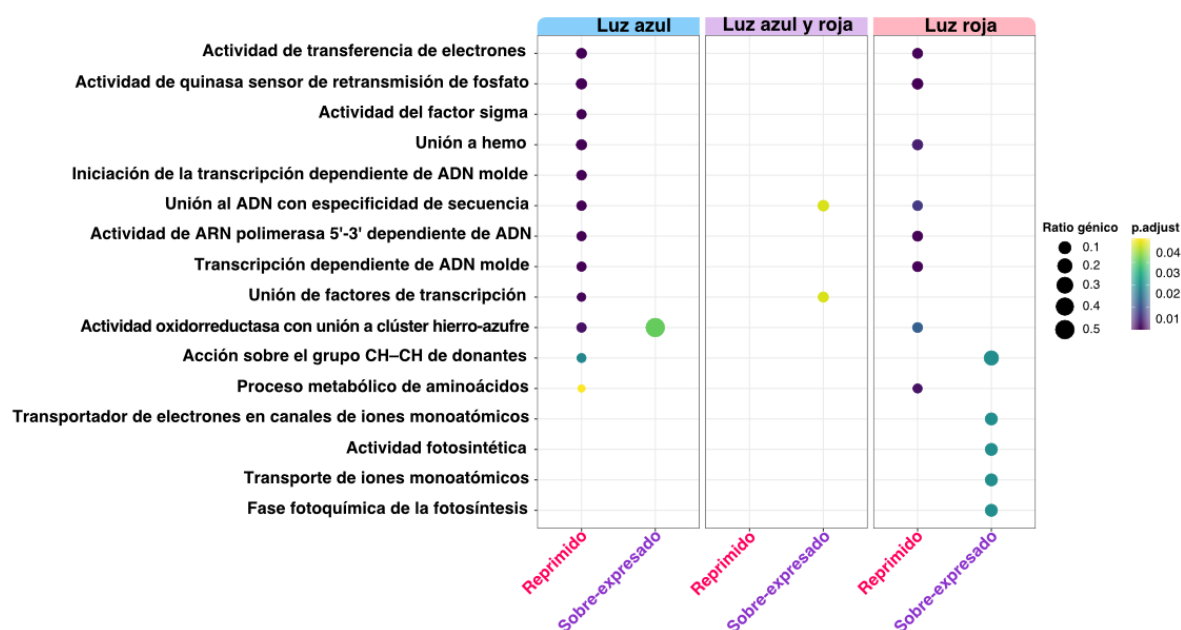


Figura 32.- Visión general consolidada del análisis de enriquecimiento funcional GO. La gráfica integra los términos más significativos de procesos biológicos BP y funciones moleculares MF, mostrando el solapamiento y las especificidades de la respuesta molecular a las diferentes longitudes de onda.

En conjunto, los resultados del enriquecimiento funcional pintan un panorama coherente: tanto la luz azul como la roja desencadenan una respuesta transcripcional masiva*que afecta centralmente a:

- La fotosíntesis y el metabolismo energético (e.g., fase fotoquímica, transferencia de electrones).

- El transporte de iones y metabolitos.
- La expresión y regulación génica a nivel transcripcional.

La luz azul, en particular, mostró una señal de enriquecimiento más fuerte y específica en funciones relacionadas con la transducción de señales (quinasas) y la transcripción (factores sigma, ARN polimerasa), sugiriendo un papel potencialmente más destacado en la activación de programas genéticos regulatorios. Esto proporciona una base mecanística sólida para los fenotipos observados de acumulación de lípidos, vinculando la percepción de la luz directamente con la reprogramación del metabolismo central.

7.14. Análisis comparativo de la respuesta funcional a la luz azul y roja mediante categorías de genes ortólogos (COG)

Para cuantificar y comparar de manera integral las funciones celulares más impactadas por cada tipo de fotoestimulación, los genes diferencialmente expresados (DEGs) en los tratamientos de luz azul y luz roja fueron categorizados utilizando el sistema de Clusters de Genes Ortólogos (COG). Este análisis funcional de alto nivel permite agrupar los genes en categorías funcionales amplias y comparar el número de DEGs asignados a cada categoría entre ambos tratamientos (**Figura 33**).

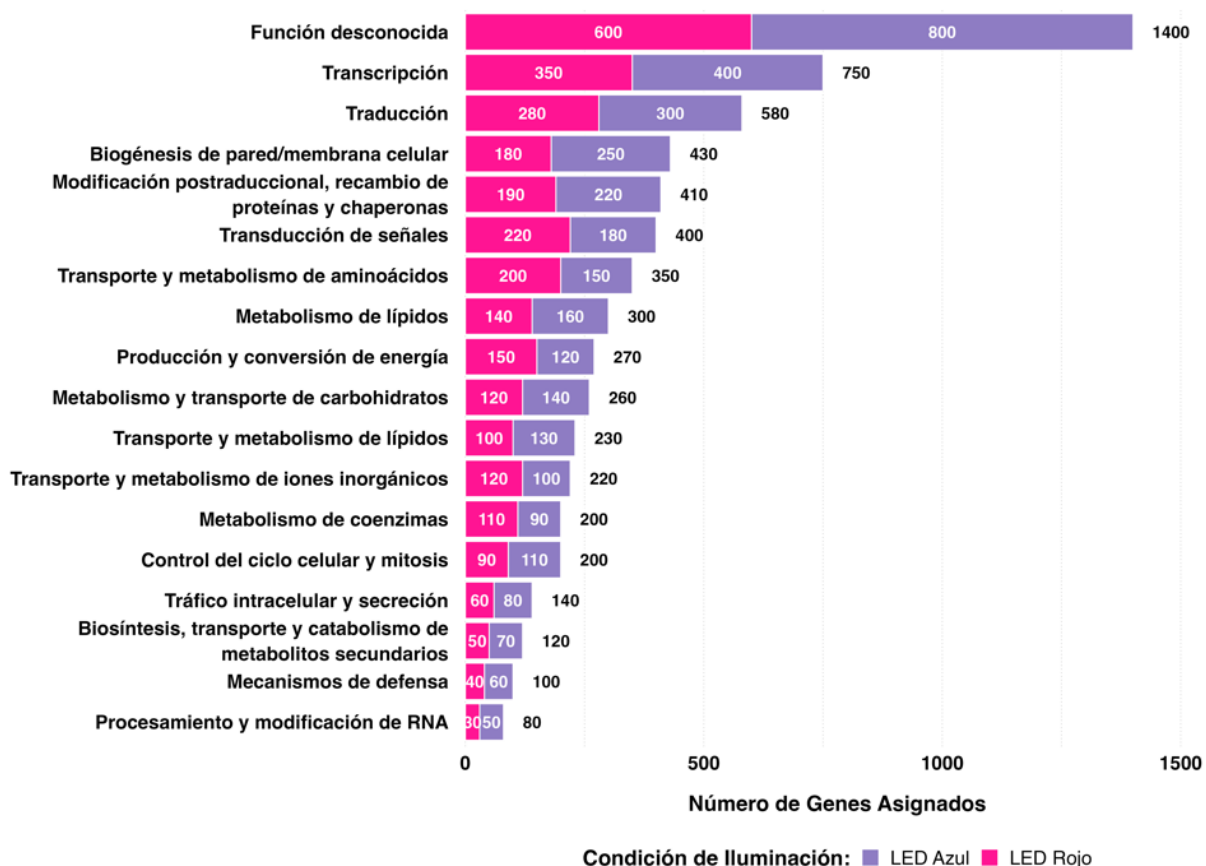


Figura 33.- Análisis comparativo de la asignación funcional de genes diferencialmente expresados en categorías COG (Clusters of Orthologous Groups). El gráfico de barras compara el número de genes asignados a cada categoría funcional broad entre los tratamientos de luz azul (barras inferiores) y luz roja (barras superiores), cuantificando el impacto diferencial en los procesos celulares.

El análisis reveló una reprogramación masiva del transcriptoma, con más de 800 genes de función desconocida modulados en cada tratamiento, lo que subraya el vasto potencial de descubrimiento biológico que aún representan estas microalgas. Entre las funciones anotadas, se observaron patrones de respuesta compartidos y específicos para cada longitud de onda.

Los resultados del análisis comparativo revelan que ambas longitudes de onda azul y roja indujeron cambios profundos en los procesos de expresión génica, afectando de manera significativa las funciones informativas de la célula. La categoría más enriquecida fue Transcripción (~350 genes), seguida de Traducción (~280 genes) y Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas (~190-220

genes). Esto confirma que la respuesta primaria a la fotoestimulación consiste en una reprogramación integral que abarca desde la regulación transcripcional hasta la síntesis, el plegamiento y la estabilidad proteica.

Asimismo, se observó una fuerte modulación en categorías vinculadas al metabolismo de lípidos y su transporte (~140 genes en ambos casos por tratamiento), lo que provee una base transcriptómica sólida para la acumulación de lípidos observada bioquímicamente. La categoría “Producción y conversión de energía” (~160 genes) también mostró un enriquecimiento notable, reflejando los reajustes del metabolismo energético necesarios para sostener la biosíntesis lipídica.

La luz azul moduló genes de biogénesis de pared y membrana celular, transporte y metabolismo de aminoácidos. La luz roja enriqueció genes de transducción de señales, sugiriendo su papel en la activación de vías de señalización específicas.

La fotoestimulación podría influir en procesos de división y crecimiento celular al afectar categorías funcionales como el transporte y metabolismo de carbohidratos, el transporte de iones inorgánicos y el control del ciclo celular y la mitosis.

7.15. Mapeo funcional de rutas metabólicas mediante la base de datos KEGG

Para identificar genes diferencialmente expresados y comprender la respuesta celular, los transcritos significativos de los análisis previos se asignaron a las rutas metabólicas de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG), enfocándose en las rutas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, precursores clave para el biodiesel.

La interpretación de mapas de rutas metabólicas se basó en un sistema de codificación visual: Las enzimas inducidas por luz azul se destacan en fondo verde. Las inducidas por luz roja se marcan con fondo rojo. Se utilizaron recuadros rojos para resaltar nodos metabólicos o sitios de interés regulatorio detectados en el análisis. Las enzimas mencionadas en las figuras son candidatos prioritarios para

estudios funcionales en la producción de biocombustibles, por su relevancia en la optimización de la síntesis de lípidos en microalgas.

7.15.1. Modulación de rutas metabólicas de interés bioenergético en *Scenedesmus acutus*

El análisis del transcriptoma de *S. acutus* reveló una profunda reorganización de su metabolismo en respuesta a las diferentes calidades de luz. Las siguientes vías describen las rutas metabólicas clave que fueron significativamente moduladas, con un enfoque en aquellas directamente implicadas en la producción de precursores bioenergéticos y la biosíntesis de lípidos, construyendo un flujo de carbono desde su fijación inicial hasta su almacenamiento final.

7.15.1.1. Fijación de carbono y metabolismo central (Rutas ko00710, ko00010) en *Scenedesmus acutus*

El análisis de la ruta de Fijación de Carbono (KEGG: ko00710) revela que la luz azul induce una sobrerregulación general en las enzimas del ciclo de Calvin-Benson, incluyendo RuBisCO, PGK y GAPDH (resaltadas en verde, **Figura 34**). El aspecto central de esta respuesta, sin embargo, se ubica en la conversión de 3-PGA a G3P, un nodo metabólico fundamental que se destaca en rojo. Este mismo punto de conexión aparece activado en la ruta de Glucólisis/Gluconeogénesis (KEGG: ko00010, **Figura 35**), lo que evidencia un mecanismo coordinado para desviar el carbono fijado hacia la producción de piruvato y, a su vez, de precursores para la síntesis de lípidos.

CARBON FIXATION IN PHOTOSYNTHETIC ORGANISMS

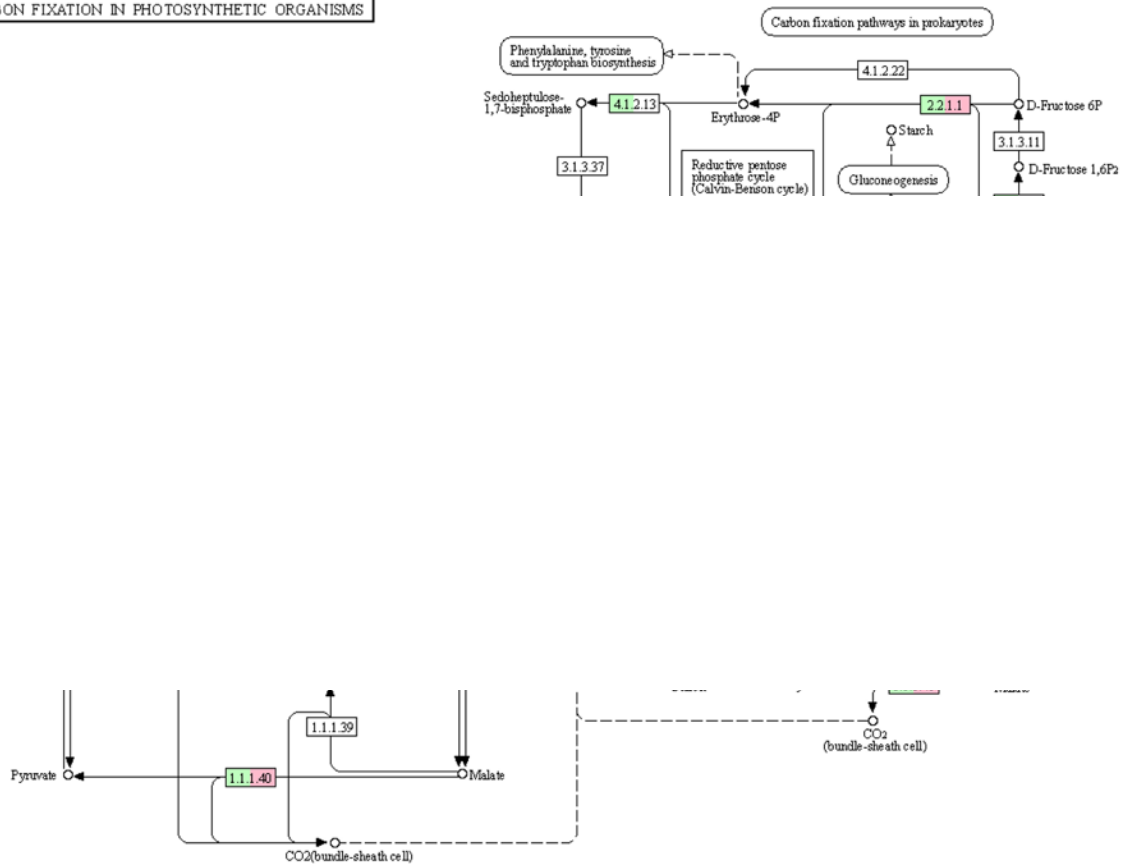


Figura 34.- Ruta de fijación de carbono en *S. acutus* (KEGG: ko00710). El mapa ilustra la inducción del ciclo de Calvin-Benson por la luz azul, evidenciada por la sobreexpresión de las enzimas RuBisCO, PGK y GAPDH (fondo verde). La conversión de 3-PGA a G3P se destaca con un recuadro rojo, identificándose como un punto de control regulatorio clave en esta vía.

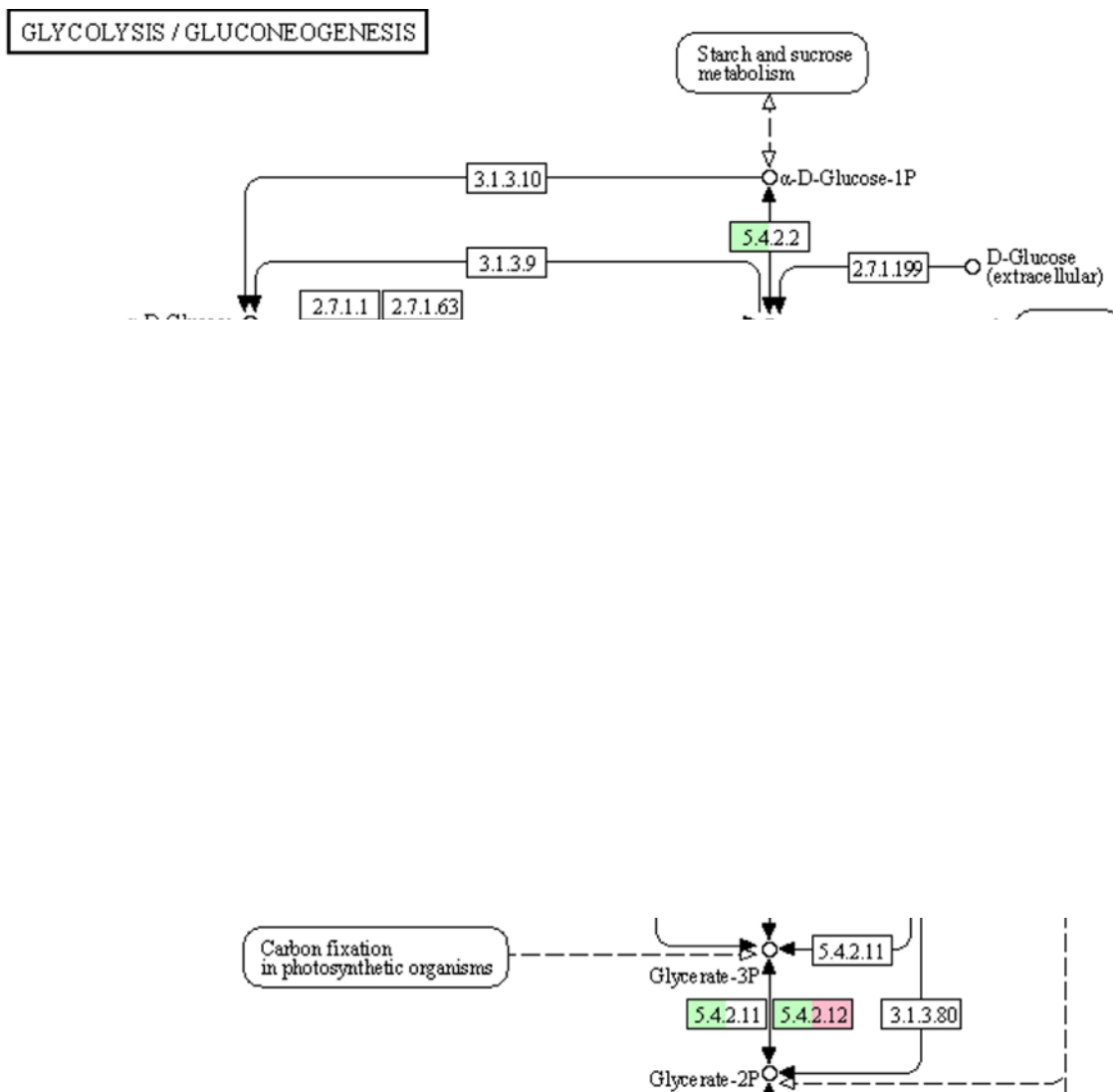


Figura 35.- Ruta de glucólisis / gluconeogénesis en *S. acutus* (KEGG: ko00010). El mapa evidencia un mayor flujo de carbono desde el ciclo de Calvin, mostrando la sobrerregulación de enzimas que conducen a la producción de piruvato. La etapa crítica, destacada con un recuadro rojo, es la conversión de 3-PGA a G3P, un paso fundamental ya que el G3P, cuya síntesis involucra a la enzima clave GAPDH, es el precursor exportado del cloroplasto para alimentar la glucólisis y la biosíntesis de lípidos.

7.15.1.2. Biosíntesis de ácidos grasos (Ruta ko00061) en *S. acutus*

La ruta de Biosíntesis de Ácidos Grasos (KEGG: ko00061) presenta una respuesta regulatoria compleja, donde ciertas enzimas son sensibles a ambas calidades de luz. Tal es el caso de la subunidad beta-carboxiltransferasa (BCX1) y la beta-

cetoacil-ACP reductasa (KAR), las cuales muestran inducción transcripcional tanto con luz azul como con luz roja, según se observa en la **Figura 36**. No obstante, el punto de regulación más notable en esta vía es la Enoil-[acil-carrier protein] reductasa (fabV). Esta enzima, enmarcada en rojo, evidencia una fuerte y específica sobreexpresión únicamente bajo el estímulo de la luz roja, identificándola como un elemento clave en la modulación de la ruta por esta longitud de onda.

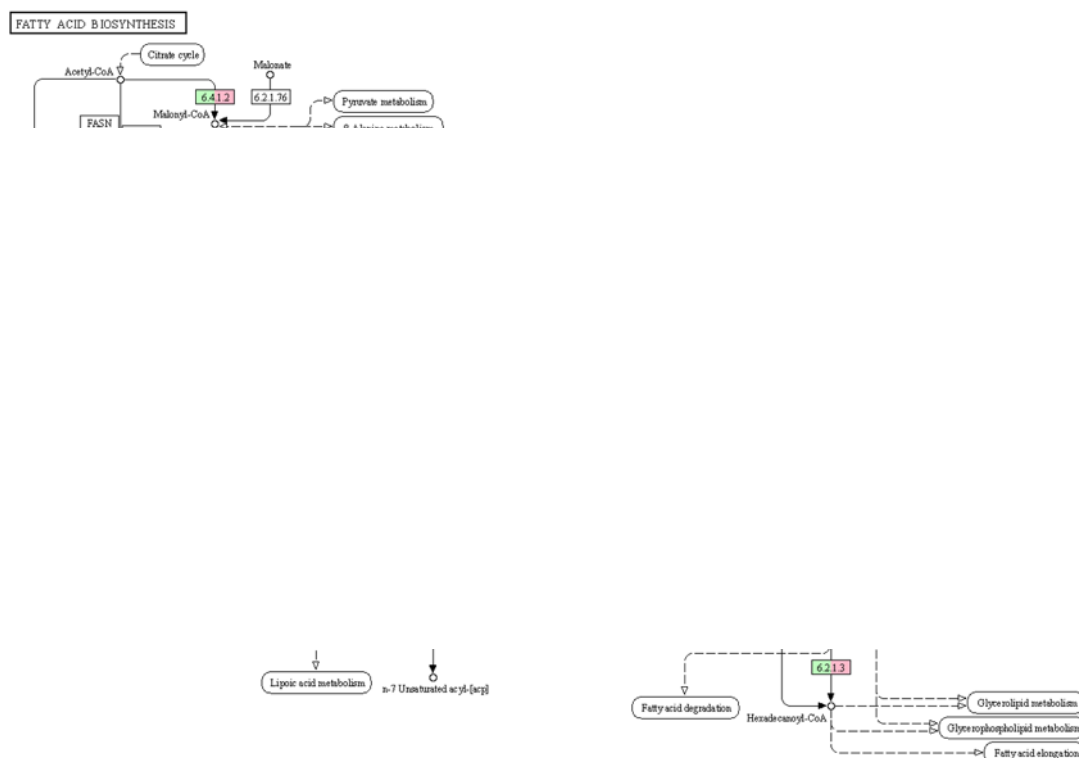


Figura 36.- Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en *S. acutus* (KEGG: ko00061). El mapa ilustra una regulación compleja por la luz. Las enzimas clave BCX1 y KAR (fondo verde y rojo) son inducidas transcripcionalmente tanto por luz azul como por luz roja. El punto de control principal de la ruta, la Enoil-[acil-carrier protein] reductasa (fabV), enmarcada en rojo, evidencia una fuerte y específica sobreexpresión únicamente bajo el estímulo de la luz roja.

7.15.1.3. Síntesis de glicerolípidos y triacilglicerolos (Ruta ko00561) en *Scenedesmus acutus*

La ruta del Metabolismo de Glicerolípidos (KEGG: ko00561) ilustra cómo se regula el almacenamiento de ácidos grasos en forma de TAGs. El proceso inicia con la

inducción de las enzimas GPAT y LPAAT, que responden tanto a la luz azul (indicado con fondo verde) como a la roja (fondo rojo), según la **Figura 37**. Sin embargo, el control principal de la ruta recae sobre el paso final, catalizado por una DGAT fuertemente sobreexpresada. La centralidad de esta reacción queda subrayada por el nodo del ácido fosfatídico, localizado en el mapa dentro de un rectángulo rojo para señalarlo como punto de interés metabólico.

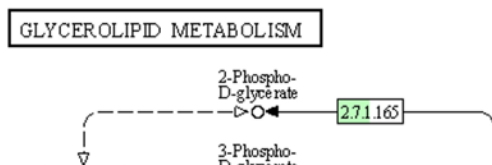


Figura 37.- Ruta del metabolismo de glicerolípidos en *S. acutus* (KEGG: ko00561). El mapa muestra la inducción de enzimas clave de la vía de Kennedy, incluyendo GPAT, LPAAT y DGAT, por la luz azul (fondo verde) y roja (fondo rojo). El intermediario ácido fosfatídico, enmarcado en rojo, se identifica como el punto de ramificación crucial que desvía el flujo metabólico hacia la síntesis de fosfolípidos o de triacilglicerolos (TAGs).

7.15.2. Reconfiguración del metabolismo lipídico en *Chlorella vulgaris*

El análisis funcional del transcriptoma de *C. vulgaris* también demostró una reprogramación metabólica sustancial orientada a la producción de lípidos. Sin embargo, la comparación con *S. acutus* revela un conjunto distinto de nodos regulatorios clave, lo que sugiere la existencia de estrategias moleculares especie-específicas para responder a la fotoestimulación.

7.15.2.1. Biosíntesis de ácidos grasos (Ruta ko00061) en *Chlorella vulgaris*

El mapa de la *Biosíntesis de Ácidos Grasos* (ID de KEGG: ko00061) para *C. vulgaris*, presentado en la **Figura 38**, muestra un patrón de regulación distinto. Los principales puntos de interés regulatorio, enmarcados en rectángulos rojos, son la subunidad de la proteína transportadora de biotina carboxilo (BCR) del complejo ACC, la Beta-cetoacil-ACP sintasa (KAS), que incluye la isoforma Beta-cetoacil-ACP sintasa I (KASI o FabB), y la Proteína transportadora de acilos (ACP o FabA). De estas, BCR y KAS exhiben la sobrerregulación más prominente con un intenso resaltado verde, indicativo de una fuerte inducción bajo la condición de luz azul.

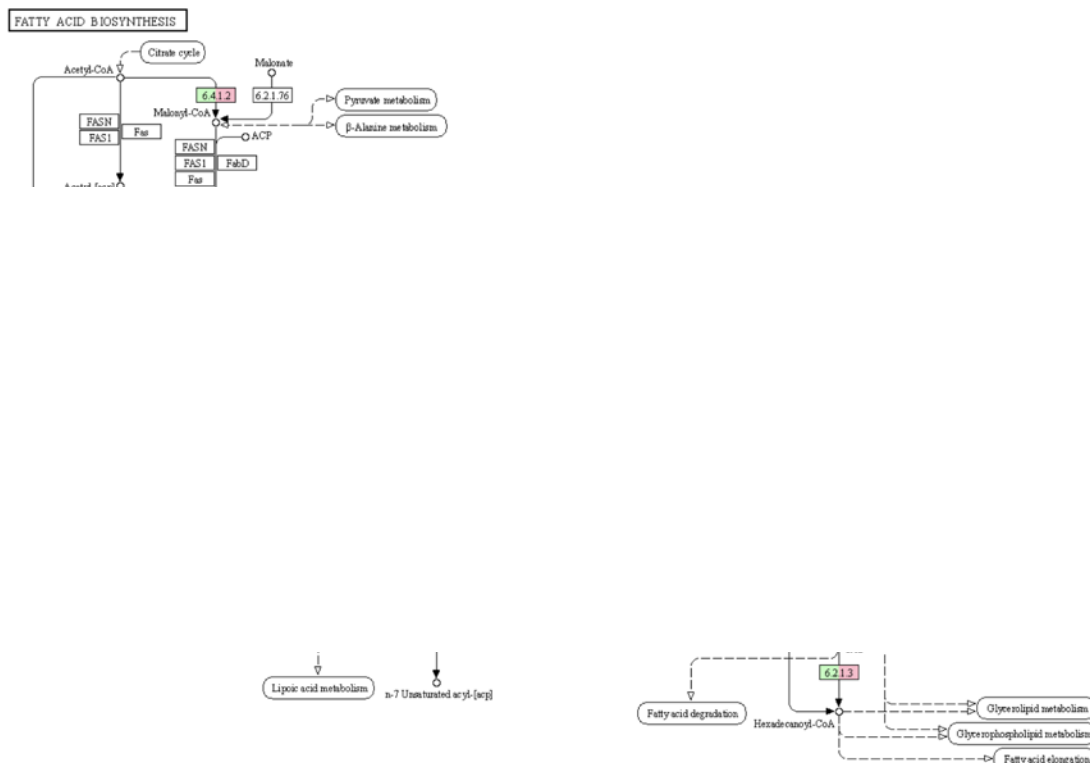


Figura 38.- Ruta de biosíntesis de ácidos grasos en *C. vulgaris* (KEGG: ko00061). El mapa revela una fuerte inducción por luz azul (fondo verde) de dos enzimas clave: la subunidad BCR del complejo ACC (Fab) y la beta-cetoacil-ACP sintasa (KAS). Ambas enzimas, enmarcadas en rojo, se identifican como los principales puntos de control regulatorio, lo que sugiere una estrategia coordinada para maximizar el flujo de carbono a través de la vía.

7.15.2.2. Síntesis de Glicerolípidos y Triacilglicerolos (Ruta ko00561) en *Chlorella vulgaris*

En *C. vulgaris*, el mapa del Metabolismo de Glicerolípidos (KEGG: ko00561) revela un patrón de regulación positiva en la vía de Kennedy, donde isoformas de la Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y la Diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT) son inducidas tanto por la luz azul (resaltado verde) como por la roja (resaltado rojo), según la **Figura 39**. La base de esta ruta se destaca con un rectángulo rojo que enmarca a la Glicerol quinasa (glpK). Esta enzima es clave, pues cataliza la fosforilación del glicerol para producir el esqueleto de sn-glicerol-3-fosfato, indispensable para toda la síntesis posterior de glicerolípidos.

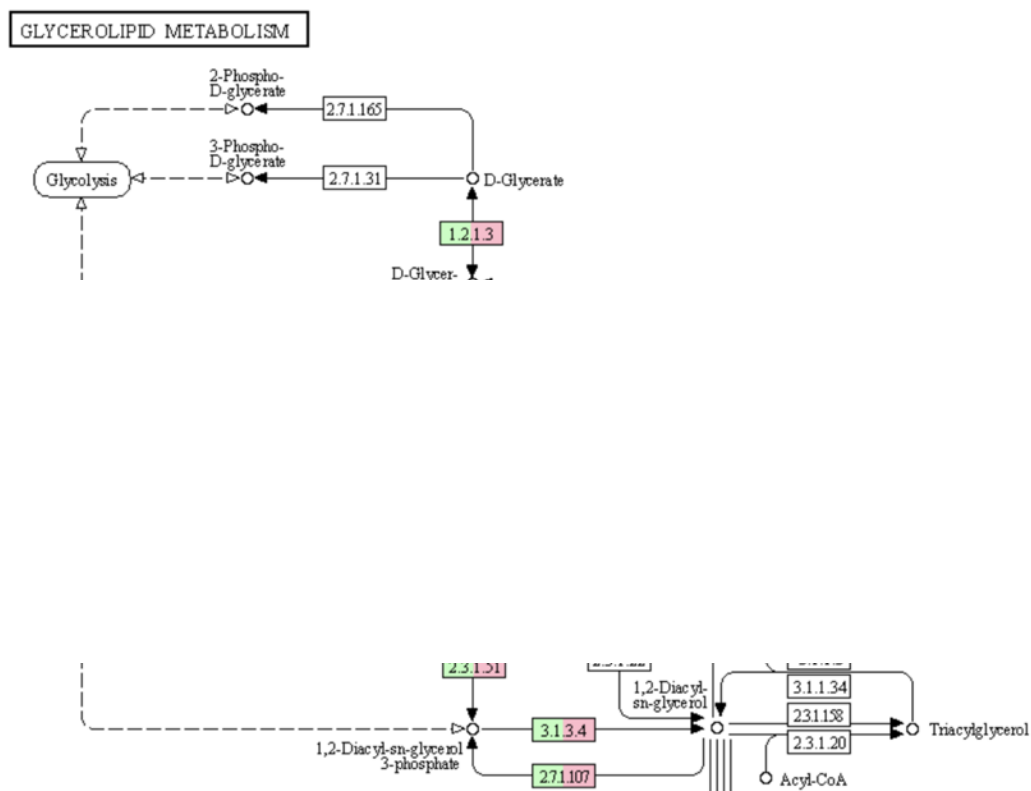


Figura 39.- Ruta del Metabolismo de Glicerolípidos en *C. vulgaris* (KEGG: ko00561). El mapa muestra un patrón de regulación positiva en la vía de Kennedy, similar al de *S. acutus*, con la inducción de GPAT y DGAT por luz azul (verde) y roja (rojo). El punto de interés clave, enmarcado en rojo, es la Glicerol quinasa (glpK). Esta enzima es fundamental, ya que cataliza la fosforilación del glicerol para generar el esqueleto de sn-glicerol-3-fosfato, paso inicial para toda la síntesis de glicerolípidos.

7.15.3. Síntesis comparativa y estrategias regulatorias especie

El mapeo KEGG confirma que tanto la luz azul como la roja son potentes moduladores del metabolismo lipídico en *S. acutus* y *C. vulgaris*, induciendo una reprogramación transcripcional que abarca desde la fijación de carbono hasta la síntesis de triacilglicerol. Sin embargo, a pesar de que ambas condiciones lumínicas conducen a un fenotipo similar, un mayor potencial para acumular lípidos, los mecanismos moleculares y los puntos de control difieren notablemente entre las dos especies, lo que sugiere estrategias de adaptación a la luz evolutivamente distintas.

Para facilitar una comparación directa, la **Tabla 5** resume las enzimas clave cuya expresión fue regulada diferencialmente, junto con la interpretación de la estrategia regulatoria inferida para cada microalga. Estas reconfiguraciones metabólicas proporcionan el fundamento de los fenotipos bioquímicos observados, y la identificación de estos nodos regulatorios específicos para cada especie abre nuevas y prometedoras vías para la ingeniería metabólica dirigida.

Tabla 5.- Resumen de enzimas clave en rutas de biosíntesis de lípidos con expresión diferencialmente regulada por luz azul y roja en *S. acutus* y *C. vulgaris*. El Símbolo (↑): Significa "sobreexpresión" o "aumento en la expresión del gen" en comparación con la condición de control (luz blanca).

El número de flechas (↑, ↑↑, ↑↑↑) indica la magnitud o la fuerza de esa sobreexpresión. ↑: Una sobreexpresión significativa. ↑↑: Una sobreexpresión fuerte. ↑↑↑: Una sobreexpresión muy fuerte.

Ruta metabólica (kegg id)	Enzima clave (nombre y ec)	<i>S. acutus</i> (regulación por luz)	<i>C. vulgaris</i> (regulación por luz)	Interpretación de la estrategia regulatoria
Biosíntesis de ácidos grasos (KO00061)	Acetil-CoA carboxilasa (BCX1) [EC:6.4.1.2]	↑↑ Azul, ↑↑ Roja	Expresión basal	Control del flujo de entrada: <i>S. acutus</i> regula potentemente el primer paso comprometido para modular la tasa general de síntesis.
	Acetil-CoA carboxilasa (BCR) [EC:6.4.1.2]	Expresión basal	↑↑ Azul, ↑ Roja	Aumento del sustrato: <i>C. vulgaris</i> aumenta la producción de malonil-CoA para alimentar el motor de síntesis.
	β-cetoacil-ACP sintasa (KAS) [EC:2.3.1.41]	Expresión basal	↑↑↑ Azul, ↑ Roja	Maximización del flujo: <i>C. vulgaris</i> sobrerregula masivamente el motor de elongación para una producción de alto rendimiento.
	β-cetoacil-ACP reductasa (KAR) [EC:1.1.1.100]	↑ Azul, ↑ Roja	Expresión basal	Soporte a la elongación: <i>S. acutus</i> muestra una inducción de apoyo, pero no es el principal punto de control.
	Estearoil-ACP desaturasa (SAD) [EC:1.14.19.2]	↑↑↑ Azul, ↑↑ Roja	Expresión basal	Control de la calidad del producto: <i>S. acutus</i> controla finamente la composición de los ácidos grasos, favoreciendo la producción de C18:1.
Metabolismo de glicerolípidos (KO00561)	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) [EC:2.3.1.15]	↑ Azul, ↑ Roja	↑ Azul, ↑ Roja	Conservado: Ambas especies activan el primer paso del ensamblaje de TAGs de manera similar.
	Diacylglicerol O-aciltransferasa (DGAT) [EC:2.3.1.20]	↑↑ Azul, ↑ Roja	↑↑ Azul, ↑ Roja	Control del destino final: Ambas especies aseguran potentemente que los diacylglicerol se canalicen hacia el almacenamiento de TAGs, priorizando la reserva de energía.

7.16. Validación de los resultados del RNA-Seq mediante RT-qPCR

Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real para dos propósitos principales: confirmar la presencia de genes identificados en el transcriptoma a partir de las rutas KEGG de interés, asegurando que estén presentes y activamente transcritos en el ARN de las microalgas, y validar la modulación, cuantificando la expresión relativa de estos genes bajo condiciones de luz azul y roja para verificar que las rutas metabólicas asociadas (lípidos, carbohidratos y energía) sean efectivamente moduladas por la calidad de la luz, según lo sugerido por el análisis bioinformático.

El análisis de enriquecimiento funcional utilizando las bases de datos de Gene Ontology (GO) y la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) (reveló una sobreexpresión significativa de genes diferencialmente expresados (DEGs) en rutas metabólicas centrales. Destacaron especialmente las vías relacionadas con el metabolismo de lípidos, el metabolismo de carbohidratos, la producción y conversión de energía, y notablemente, los procesos de transcripción y traducción, lo que sugiere una reorganización integral de la maquinaria informacional y metabólica de la célula.

Los genes asociados con el metabolismo de lípidos están en color morado, los del metabolismo energético en verde, y los del metabolismo de carbohidratos en azul. Estos genes se expresaron al ser expuestos a luz roja o azul en la microalga **Tabla 6.**

Tabla 6.- Genes clave identificados por análisis funcional (GO/KEGG) para validación por RT-qPCR

Símbolo	Nombre	Metabolismo	Ruta
fabD, MCAT, MCT1	[Proteína portadora de acilo] S-maloniltransferasa [EC:2.3.1.39]	Lípidos	Biosíntesis de ácidos grasos
fabV, ter	Enoil-[proteína transportadora de acilo] reductasa/trans-2-enoil-CoA reductasa (NAD+) [EC:1.3.1.9 1.3.1.44]		
MCH	Acil-[proteína portadora de acilo] hidrolasa de cadena media [EC:3.1.2.21]		
E1.3.3.6, ACOX1, ACOX3	Acil-CoA oxidasa [EC:1.3.3.6]		Degradación de ácidos grasos
paaF, echA	Enoil-CoA hidratasa [EC:4.2.1.17]		Metabolismo de glicerolípidos
dgkA, DGK	Diacilglicerol quinasa (ATP) [EC:2.7.1.107]	Energéticos	Fijación de carbono en organismos fotosintéticos.
rpiA	Ribosa 5-Fosfato isomerasa A [EC:5.3.1.6]		
GAPDH, gapA	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (fosforilación) [EC:1.2.1.12]	Carbohidratos	Glucólisis/ Gluconeogénesis
GAPDH, gapA	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (fosforilación) [EC:1.2.1.12]		

Utilizando la secuencia de nucleótidos de los genes de interés obtenida de los conteos funcionales y del gen control housekeeping, que se mantuvo constitutiva y estable en todos los tratamientos según el análisis bioinformático, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la PCR en tiempo real. Estos oligos se desarrollaron para cada gen de interés en *Secedismus acutus* (**Tabla 7**) y *Chlorella vulgaris*

Tabla 8), permitiendo un barrido entre las rutas de producción de ácidos grasos como potencial bioenergético.

Tabla 7.- Oligonucleótidos diseñados para la validación por RT-qPCR en *S. acutus*

Gen	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
ACOX	155	60.04	55-60		
PAAF	120	59.97	55		
FabD	102	59.97	55-50		
FabV	154	59.97	50		
MCH	94	60	50-55		
dgkA	162	59.97	55		
rpiA	198	59.97	55-60		
GAPDH	101	60	60-50		
GAPDH	129	60	55		

SCTR (Control)	155	60.05	52-55	
---------------------------	-----	-------	-------	--

Tabla 8.- Oligonucleótidos diseñados para la validación por RT-qPCR en *C. vulgaris*

Gen	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
FabB	125	58.35	50-55		
fabA	114	58.81	60		
glpK	60	60.11	55-60		
petD	97	60.67	52-60		
1659	131	59.61	60		
2318	136	59.89	60		
41139	90	59.69	55		
680	114	59.95	46-55		
SCTR (Control)	155	60.05	52-55		

Los valores de Ct obtenidos en la PCR en tiempo real fueron analizados con el método de $\Delta\Delta C_t$ para poder obtener los niveles de expresión. Podemos observar en la **Figura 40** la expresión relativa de cuatro genes seleccionados en *C. vulgaris* que se detallan a continuación: Gen CGK: Presenta una sobreexpresión notable

bajo luz azul, con un nivel de expresión relativa de aproximadamente 7, mucho mayor que el control de luz blanca (cerca de 1.5) y mínima bajo luz roja. Gen CFA: Exhibe un patrón de regulación opuesto al de CGK, con una fuerte sobreexpresión selectiva bajo luz roja, alcanzando casi 9. Su expresión es baja bajo luz blanca (alrededor de 1.2) y casi nula bajo luz azul. **Genes CFB y C23:** Muestran niveles de expresión relativamente bajos en todas las condiciones. El gen C23 tiene su mayor expresión bajo el control de luz blanca, disminuyendo con las luces de colores.

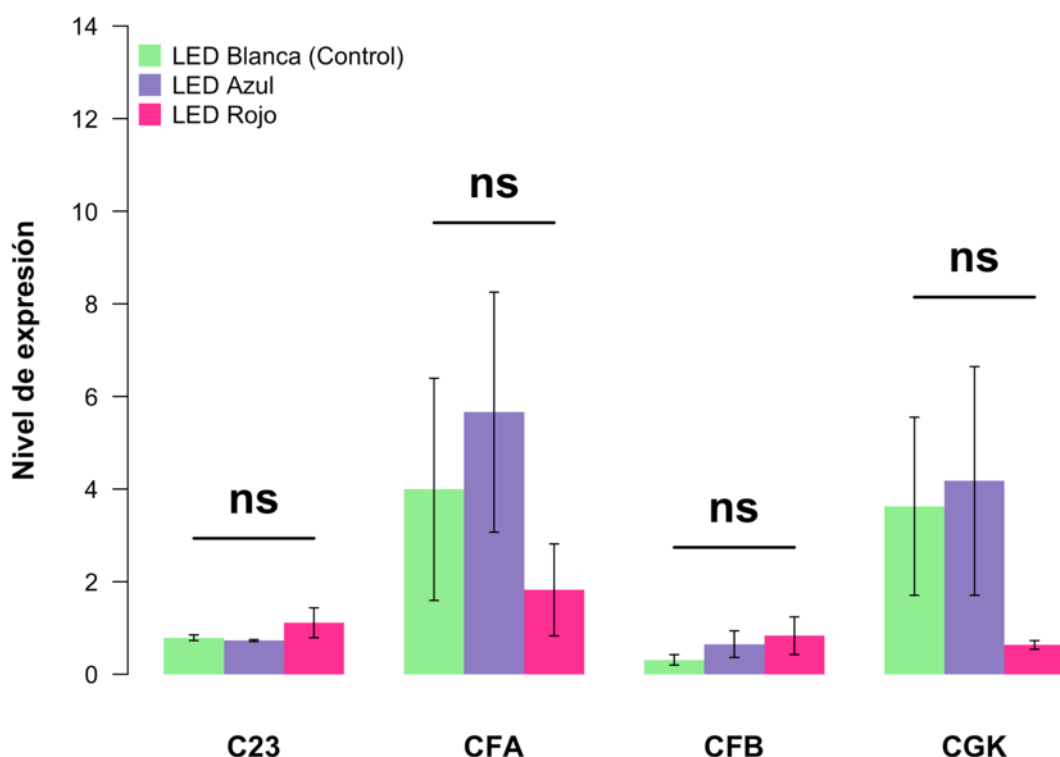


Figura 40.- Expresión relativa de genes clave en *C. vulgaris* validada por RT-qPCR. La gráfica muestra los niveles de expresión de los genes C23, CFA, CFB y CGK bajo condiciones de luz LED azul y roja, normalizados contra el control de luz blanca. Las barras de error indican la desviación estándar de las réplicas biológicas. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ns) en este análisis

Para *S. acutus*, la **Figura 41** muestra el gen PAAF, que se sobreexpresó significativamente bajo luz azul (aproximadamente 30) y luz roja (aproximadamente 10) en comparación con el control de luz blanca. La expresión del gen GAPDH aumentó notablemente en ambas condiciones de luz de color, con un incremento

mayor bajo luz roja (cerca de 70), superando al observado con luz azul (aproximadamente 18). Al igual que PAAF, el gen MCH mostró sobreexpresión significativa bajo luz azul (30) y luz roja (aproximadamente 15) en comparación con el control. A diferencia de los otros genes, FAB V no presentó diferencias significativas en sus niveles de expresión entre los distintos tratamientos de luz.

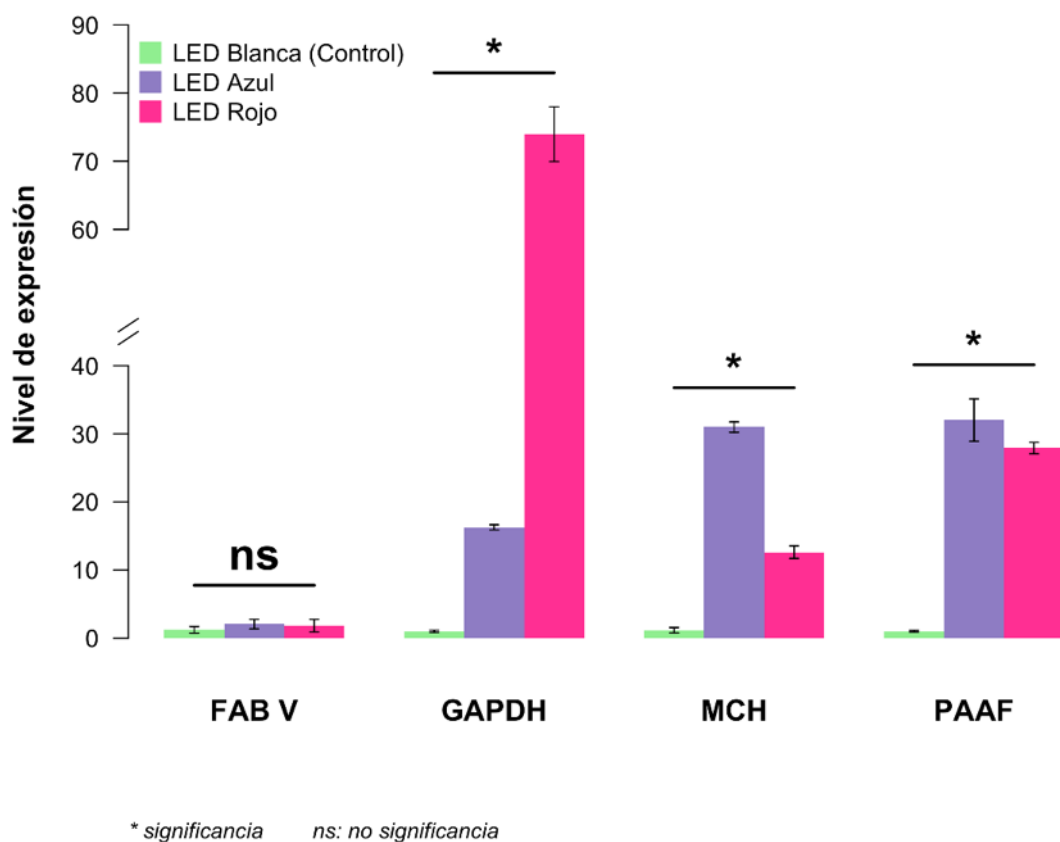


Figura 41.- Expresión relativa de genes clave en *S. acutus* validada por RT-qPCR. Se comparan los niveles de expresión de los genes FAB V, GAPDH, MCH y PAAF bajo luz LED azul y roja frente al control de luz blanca. La sobreexpresión de GAPDH, MCH y PAAF fue estadísticamente significativa, mientras que FAB V no mostró cambios relevantes. Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica una diferencia significativa ($p < 0.05$)

La **Figura 42** resume los hallazgos de la localización de la expresión relativa en las microalgas *C. vulgaris* (recuadros color rosa) y *S. acutus* (recuadros color azul)

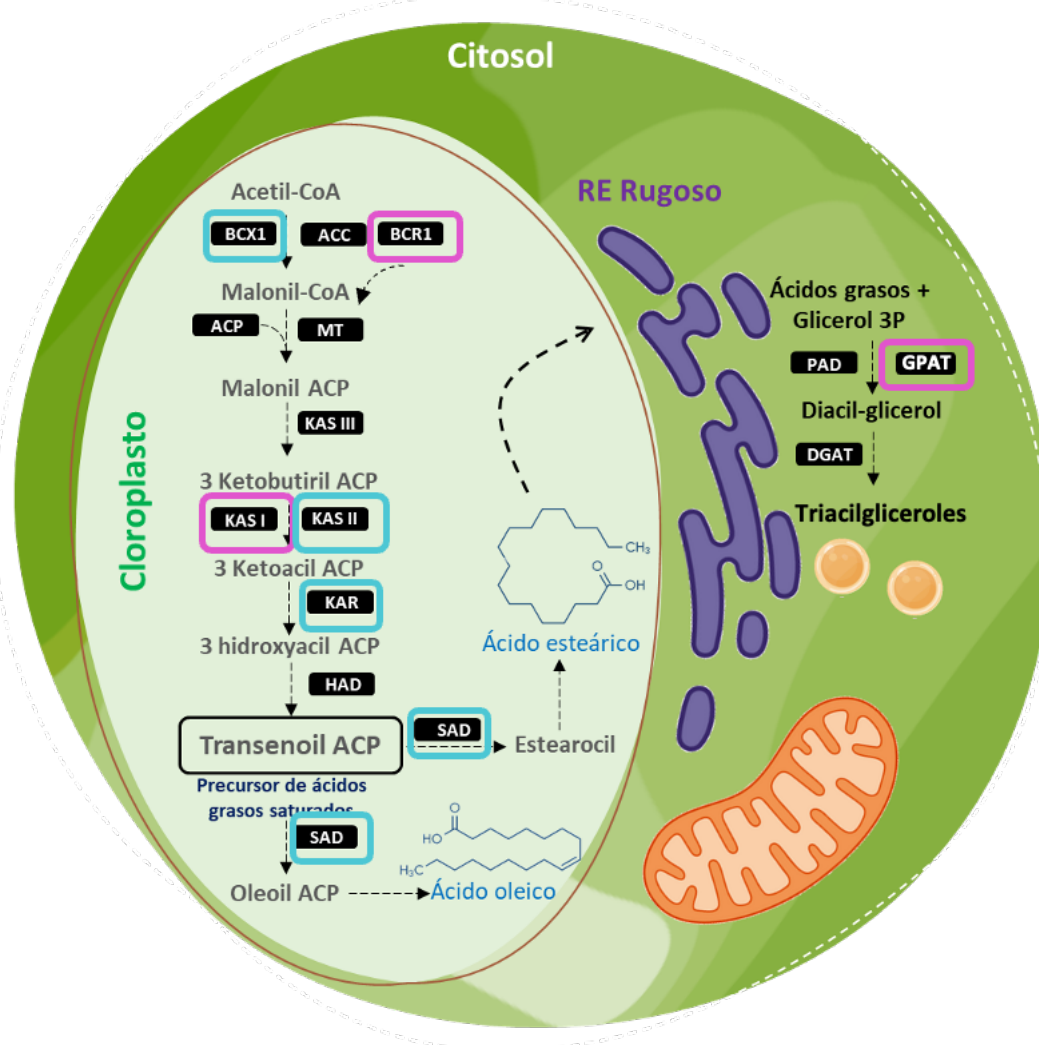


Figura 42.- Modelo comparativo de la ruta de biosíntesis de lípidos y puntos de regulación en *C. vulgaris* y *S. acutus*. El esquema ilustra las etapas clave de la síntesis de ácidos grasos en el cloroplasto y su ensamblaje en triacilglicerol en el retículo endoplasmático. Los recuadros rosas resaltan las enzimas sobreexpresadas en *C. vulgaris*, mientras que los recuadros azules indican las enzimas sobreexpresadas en *S. acutus*, de acuerdo con los hallazgos del estudio.

8. Discusiones

La respuesta de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* a distintas calidades de luz muestra una compleja red de adaptaciones fisiológicas y moleculares que van más allá de ajustar la tasa fotosintética. Este estudio revela que, aunque la luz es la principal fuente de energía, su espectro actúa como una señal reguladora que provoca una reprogramación metabólica celular profunda, permitiendo a las microalgas optimizar la partición del carbono y la acumulación de lípidos de manera específica para cada especie. El análisis de las cinéticas de crecimiento, ajustado con precisión por el modelo de Gompertz, presenta una paradoja central: ambas microalgas mostraron una tasa máxima de crecimiento específico (μ_{Max}) ligeramente mayor bajo luz azul, indicando una mayor eficiencia en la división celular. Sin embargo, este aumento en la velocidad de crecimiento no resultó en una mayor acumulación final de biomasa ni en un incremento del contenido de lípidos neutros o totales al final del cultivo. De hecho, mientras que la luz azul no causó diferencias significativas en el contenido lipídico en comparación con la luz blanca, la luz roja disminuyó la acumulación de lípidos. Esta desconexión entre una mayor tasa de crecimiento y la acumulación de lípidos es un fenómeno documentado que destaca el compromiso metabólico entre la proliferación celular y el almacenamiento de reservas energéticas (Wang et al., 2022; Srivastava et al., 2020).

La célula debe elegir entre invertir el carbono fijado en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos para dividirse, o desviarlo hacia la producción de triacilglicerol (TAGs) para resistir futuros estrés. La adaptación a diferentes condiciones lumínicas fue exitosa, evidenciada por el significativo aumento en la concentración de clorofila total en ambas especies al final del cultivo, lo que indica una maquinaria fotosintética activa y saludable. Sin embargo, este aumento en la capacidad fotosintética no fue suficiente para impulsar la lipogénesis en las condiciones de

suficiencia de nutrientes de la fase exponencial. La clave para resolver esta paradoja está en el análisis transcriptómico, que revela que la luz no actúa como un inductor directo de la acumulación de lípidos, sino como una señal preparatoria o de “cebado” que equipa a la célula con la maquinaria enzimática necesaria para una lipogénesis rápida, probablemente desencadenada por una segunda señal ambiental, como la limitación de nutrientes que coincide con la transición a la fase estacionaria del cultivo (Bibi et al., 2022; Reitan et al., 1994). Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que los picos de expresión de los genes lipogénicos clave se observaron alrededor del día 12, coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria y el agotamiento de nutrientes en el medio.

El análisis del perfil de ácidos grasos establece el primer vínculo claro entre la reprogramación genética y el fenotipo bioquímico. En *C. vulgaris*, el perfil estuvo dominado por ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) como el ácido linolénico y linoleico, manteniéndose estable entre diferentes tratamientos lumínicos, aunque la luz azul favoreció ligeramente la producción de ácido linolénico. En contraste, *S. acutus* mostró una respuesta más adaptable: la luz azul y roja incrementaron significativamente los PUFAs. Este cambio se correlaciona con la sobreexpresión del gen de la Esteroil-ACP desaturasa (SAD), una enzima clave que introduce el primer doble enlace en el ácido esteárico para formar ácido oleico (C18:1), precursor de los PUFAs (López-Gomollón et al., 2019; Shanklin & Cahoon, 1998). La calidad del biodiésel depende de este perfil, siendo deseable un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados como el oleico para un equilibrio óptimo entre estabilidad oxidativa y propiedades de flujo en frío (Knothe, 2015; Rashid et al., 2018). La capacidad de *S. acutus* para ajustar su perfil de ácidos grasos en respuesta a la luz, mediada por la regulación de SAD, lo convierte en un candidato prometedor para la producción de biodiésel de alta calidad.

La variabilidad observada en el número de cetano estimado no es un resultado aislado, sino la consecuencia directa y cuantificable de la reprogramación del metabolismo lipídico inducida por la calidad de la luz. La notable disminución del NC en el biodiésel de *S. acutus* cultivado bajo luz roja (NC 44.14) en comparación con

el control de luz blanca (NC 49.17) se correlaciona directamente con el cambio en su perfil de ácidos grasos, que muestra un incremento en la fracción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y una reducción de los monoinsaturados. Este fenotipo bioquímico es consistente con los hallazgos transcriptómicos, que revelaron una sobreexpresión específica y robusta de la Enoil-[acil-carrier protein] reductasa (fabV) únicamente bajo el estímulo de la luz roja. Este hallazgo sugiere la existencia de una cascada regulatoria completa y coherente: la señal lumínica (luz roja) reconfigura la expresión de genes clave en la biosíntesis de lípidos, lo que altera la composición del perfil de FAMES, impactando a su vez, y de manera predecible, en la calidad y el rendimiento del biocombustible final. Aunque el número de cetano es un indicador primordial, la optimización de microalgas para la producción de biodiésel es un desafío multifactorial, y futuras investigaciones deberían enfocarse no solo en la modulación del NC, sino también en el ajuste fino del perfil de FAMES para cumplir simultáneamente con múltiples especificaciones de calidad.

El análisis transcriptómico, validado por RT-qPCR, revela que *S. acutus* y *C. vulgaris* emplean estrategias moleculares divergentes para la acumulación de lípidos. *S. acutus* utiliza un sofisticado “control de calidad y composición”, regulando finamente la entrada de carbono a la síntesis de ácidos grasos mediante la sobreexpresión de BCX1, subunidad beta-carboxiltransferasa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa, que cataliza el primer paso comprometido de la ruta (Huerlimann & Heimann, 2013). La expresión de BCX1 aumentó hasta 35 veces bajo luz azul, mostrando un control estricto sobre el flujo metabólico inicial. Su estrategia principal es la inducción masiva del gen SAD, cuya expresión se elevó hasta 20 veces, asegurando una composición específica de lípidos rica en C18:1. En contraste, *C. vulgaris* sigue una estrategia de “maximización de flujo y rendimiento”, activando masivamente puntos clave para eliminar cuellos de botella y aumentar la tasa de producción total. Esto se logra mediante la coordinación de la sobreexpresión de la subunidad de la proteína transportadora de biotina carboxilo (BCR) del complejo ACC, que puede aumentar hasta 6 veces, y de manera crucial, de la beta-cetoacil-ACP sintasa

(KAS), el “motor” del complejo de la ácido graso sintasa (FAS), cuya expresión se incrementó casi 30 veces bajo luz azul (Aghazadeh et al., 2024; White et al., 2005). Al aumentar simultáneamente la producción del sustrato (malonil-CoA, vía BCR) y la velocidad de elongación de la cadena (vía KAS), *C. vulgaris* se prepara para una producción de lípidos a gran escala y alta velocidad, priorizando la cantidad sobre la composición específica, lo que se refleja en la falta de una sobreexpresión comparable de SAD. Esta diferencia en la regulación de genes clave como ACC y KAS entre diferentes especies de microalgas ha sido sugerida como un reflejo de adaptaciones evolutivas a distintos nichos (Sharma et al., 2015).

Para mantener el potencial lipogénico, es crucial un suministro coordinado de precursores de carbono. En *S. acutus*, el análisis transcriptómico muestra una cascada metabólica integrada que canaliza eficientemente el carbono desde su fijación hasta los bloques de construcción de lípidos. La sobreexpresión de enzimas clave del ciclo de Calvin-Benson, como RuBisCO, PGK y GAPDH, bajo luz azul genera un “empuje” que incrementa la producción de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) (Yang et al., 2017). Este G3P se exporta al citosol, donde la sobreexpresión simultánea de las enzimas de la glucólisis crea un “tirón” que lo convierte eficientemente en piruvato. Este diseño integrado es notablemente eficiente, asegurando un suministro robusto y simultáneo de los dos precursores esenciales para la síntesis de TAGs: las unidades de acetil-CoA (derivadas del piruvato) y el esqueleto de glicerol-3-fosfato (derivado del G3P) (Tan & Lee, 2016). Esta partición del carbono, desviando el flujo desde el ciclo de Calvin hacia la glucólisis y la síntesis de lípidos, es una estrategia central en la acumulación de lípidos inducida por estrés en microalgas (Matamoros et al., 2015; Pancha et al., 2015). A pesar de las estrategias divergentes en la producción de ácidos grasos, ambas especies muestran una sorprendente convergencia en la etapa final del ensamblaje de TAGs. El análisis de la ruta del metabolismo de glicerolípidos revela una regulación positiva consistente de la vía de Kennedy en ambas microalgas. Se observa una inducción coordinada de las enzimas Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), Lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) y, de manera crucial, Diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT), que cataliza el paso final de la síntesis de TAGs (Falarz et al., 2020; Gui et

al., 2017). La fuerte inducción de DGAT en ambas especies indica una decisión celular convergente: bajo fotoestimulación, el carbono se almacena a largo plazo como lípidos neutros. Esto sugiere que, aunque la evolución ha probado diferentes métodos para producir ácidos grasos, el sistema para empaquetarlos y almacenarlos es un módulo metabólico más conservado (Chen & Smith, 2012). La identificación de nodos regulatorios especie-específicos (BCX1, SAD, BCR, KAS) no solo explica las observaciones fisiológicas, sino que también ofrece un mapa de ruta para la ingeniería metabólica, permitiendo diseñar cepas optimizadas con alta productividad y un perfil lipídico ideal para biocombustibles de próxima generación (Blatti et al., 2013; Gimpel et al., 2015; Song et al., 2024).

9. Conclusiones

1. Aunque la producción final de biomasa no presentó diferencias significativas, la luz azul indujo una mayor tasa máxima de crecimiento específico (μ_{max}) en ambas microalgas, sugiriendo una utilización más eficiente de esta longitud de onda para la división celular.
2. *C. vulgaris* demostró ser una fuente robusta de lípidos de alta calidad, con un perfil rico en ácidos grasos insaturados (~65%), especialmente poliinsaturados (PUFAs), lo que le confiere propiedades deseables para la producción de biodiesel.
3. *S. acutus* destacó por una mayor producción relativa de ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado de alto valor para biocombustibles, demostrando un potencial lipídico específico y diferente al de *C. vulgaris*.
4. *S. acutus* bajo luz blanca de amplio espectro produjo un biodiésel de calidad superior, con un número de cetano estimado de 49.17, cumpliendo con la exigente norma ASTM D6751 para su uso como componente de mezcla B100 en el mercado norteamericano y posicionándolo como el candidato más robusto para futuras aplicaciones bioenergéticas.
5. El análisis de expresión confirmó que la luz modula genes cruciales para la síntesis de lípidos. En *C. vulgaris*, la luz azul sobreexpresó los genes *KAS* y *BCR*, mientras que en *S. acutus* se indujeron los genes *SAD* y *BCX1*, lo que provee la evidencia molecular que conecta el estímulo lumínico con las rutas lipogénicas específicas de cada microalga.
6. El principal hallazgo del análisis funcional fue que la luz actúa como una señal regulatoria maestra que induce una reprogramación masiva de la maquinaria informacional de la célula. Las categorías funcionales más afectadas en ambos tratamientos fueron la Transcripción (con ~350 genes modulados) y la Traducción (con ~280 genes), indicando una reorganización celular a un nivel muy fundamental.
7. Se confirmó una fuerte modulación transcriptómica en rutas directamente asociadas a la producción de biocombustibles. Se identificaron cambios

significativos en un gran número de genes pertenecientes a las categorías de Metabolismo y transporte de lípidos (~140 genes) y Producción y conversión de energía (~160 genes), proporcionando una base transcriptómica sólida para los fenotipos observados.

8. El análisis bioinformático también reveló que cada longitud de onda activa programas genéticos parcialmente únicos. La luz azul moduló de forma particular genes de biogénesis de la pared/membrana celular y metabolismo de aminoácidos, mientras que la luz roja tuvo un mayor impacto en la categoría de transducción de señales, sugiriendo mecanismos de acción y respuesta celular distintos para cada tipo de luz.

Estos resultados resaltan la importancia de investigar y comprender los mecanismos moleculares y las vías metabólicas involucradas en la producción de lípidos en estas microalgas, lo cual puede contribuir al desarrollo de estrategias eficientes y sostenibles para la obtención de biocombustibles a partir de microalgas.

10. Bibliografia

- Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., & Iluz, D. (2016). Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*, 203, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.057>
- Aghazadeh, M., Askari, H., Farrokhi, N., & Ofoghi, H. (2024). Experimental and in silico investigations of the role of ketoacyl-ACP synthase (KAS) genes in lipid production of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen stress. *BioNanoScience*, 14(3), 2275–2287. <https://doi.org/10.1007/s12668-024-01590-y>
- ASTM International. (2020). *Specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels* (D6751-20A). <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D6751-20A>
- ASTM International. (2021). *Specification for diesel fuel* (D975-21). <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D975-21>
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>
- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551–573. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648–1663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Blatti, J. L., Michaud, J., & Burkart, M. D. (2013). Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.007>
- Bibi, F., Jamal, A., Huang, Z., Urynowicz, M., & Ali, M. I. (2022). Advancement and role of abiotic stresses in microalgae biorefinery with a focus on lipid production. *Fuel*, 316, 123192. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123192>
- Calvin, M. (1950). The path of carbon in photosynthesis. *Harvey Lectures*, 46(2), 218–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.13.060162.001055>

- Castro Tapia, J. M. (2021). *Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de lípidos, proteína total soluble, clorofila y carotenoides totales en cultivos de Scenedesmus acutus UTEX-72 y Chlorella vulgaris OW-01* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio Institucional de la UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/7192>
- Castro-Tapia, J. M., Dibildox-Alvarado, E., & Soria-Guerra, R. E. (2022). Effect of temperature on lipid accumulation in three green microalgae species. *African Journal of Biotechnology*, 21(10), 464–471. <https://doi.org/10.5897/ajb2022.17518>
- Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.125>
- Chen, J., & Smith, A. G. (2012). A look at diacylglycerol acyltransferases (DGATs) in algae. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.009>
- Chen, L., & Wong, G. (2018). Transcriptome informatics. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (Vol. 1, pp. 324–340). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20204-5>
- Comisión Reguladora de Energía. (2000). *Especificaciones de calidad de los petroquímicos*. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_to_doc.php%3Fcodnota%3D2097359
- Darvehei, P., Bahri, P. A., & Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 233–258. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>
- European Committee for Standardization. (2012). *Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines - Requirements* (EN 14214:2008). <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/cen/d3475989-a401-45ea-a3b3-27c9b71ab152/en-14214-2008?srsId=AfmBOoqMFjLyT2CURpqUgu9eAaJRjk74MsxfMVVhpbzFw465E-18KK2I>
- Falarz, L. J., Xu, Y., Caldo, K. M. P., Garroway, C. J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). Characterization of the diversification of phospholipid: diacylglycerol acyltransferases in the green lineage. *The Plant Journal*, 104(4), 936–953. <https://doi.org/10.1111/tpj.14880>

- Ganesan, R., Manigandan, S., Samuel, M. S., Shanmuganathan, R., Brindhadevi, K., Lan Chi, N. T., Duc, P. A., & Pugazhendhi, A. (2020). A review on prospective production of biofuel from microalgae. *Biotechnology Reports*, 27, e00509. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00509>
- Gimpel, J. A., Specht, E. A., Georgianna, D. R., & Mayfield, S. P. (2015). Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.038>
- Gui, W., Li, Y., Liu, J., & Li, D. (2017). Identification and characterization of an efficient acyl-CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene from the microalga *Chlorella ellipsoidea*. *BMC Biotechnology*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0995-5>
- Guimera, R., & Sales-Pardo, M. (2015). La promesa de las redes metabólicas. [Archivo PDF]. https://seeslab.net/media/filer_public/3c/78/3c78dcf1-df9f-4d74-91ac-5f9ffa04ca8d/revistasebbm_0186.pdf
- Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2018). Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology. *Lipids in Health and Disease*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z>
- Hu, S., Barati, B., Odey, E. A., Wang, S., Hu, X., Abomohra, A. E. F., Lakshmikandan, M., Yerkebulan, M., Esakkimuthu, S., & Shang, H. (2020). Experimental study and economic feasibility analysis on the production of bio-oil by catalytic cracking of three kinds of microalgae. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 149, 104835. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2020.104835>
- Huerlimann, R., & Heimann, K. (2013). A comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.668671>
- Hultberg, M., Jönsson, H. L., Bergstrand, K. J., & Carlsson, A. S. (2014). Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 159, 465–467. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.092>
- Kim, D. G., Lee, C., Park, S. M., & Choi, Y. E. (2014). Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 159, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078>

- Knothe, G. (2015). A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acids and esters. *Energy & Fuels*, 29(10), 6447–6458. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.11.020>
- Kumaresan, V., Nizam, F., Ravichandran, G., Viswanathan, K., Palanisamy, R., Bhatt, P., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Mala, K., & Arockiaraj, J. (2017). Transcriptome changes of blue-green algae, *Arthrospira* sp. in response to sulfate stress. *Algal Research*, 23, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.012>
- Kuram Tirumala, R., Subbaiyan, G. K., Singh, A. K., Furtado, A., & Henry, R. J. (2019). RNA-Seq to understand transcriptomes and application in improving crop quality. En *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22728-5>
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Lenka, S. K., Carbonaro, N., Park, R., Miller, S. M., Thorpe, I., & Li, Y. (2016). Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1046–1063. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.004>
- Liu, J., Huang, J., & Che, F. (2011). Microalgae as feedstocks for biodiesel production. En *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/25600>
- López-Gomollón, S., Hernández, M. L., & Martínez-Rivas, J. M. (2019). Transcriptional regulation of stearoyl-ACP desaturase genes in response to abiotic stresses in olive (*Olea europaea* L. cv. Picual and Arbequina). *Frontiers in Plant Science*, 10, 251. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00251>
- Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., & Bayona, J. M. (2015). Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. *Journal Of Hazardous Materials*, 288, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>
- Mohd, N., Yasin, N. H. M., & Takriff, M. S. (2021). Predictive growth model of indigenous green microalgae (*Scenedesmus* sp. UKM9) in palm oil mill effluent (POME). *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1051(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1051/1/012070>
- Montero Sánchez, Y. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes*, 1(2), 37–43. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8487603>

- Morais Junior, W. G., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 528, 735562. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735562>
- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Nitrogen stress triggered biochemical and molecular responses in the oleaginous microalga *Scenedesmus* sp. CCNM 1011. *Bioresource Technology*, 189, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Ra, C. H., Kang, C. H., Jung, J. H., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2016). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresource Technology*, 212, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.059>
- Rashid, U., Anwar, F., & Knothe, G. (2018). Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil. *Fuel Processing Technology*, 90(9), 1157–1163. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2009.05.016>
- Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology*, 30(6), 972–979. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x>
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*, 9(4), 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
- Salas-Montantes, C. J., González-Ortega, O., Ochoa-Alfaro, A. E., Camarena-Rangel, R., Paz-Maldonado, L. M. T., Rosales-Mendoza, S., Rocha-Urbe, A., & Soria-Guerra, R. E. (2018). Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1721–1733. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1393-6>
- Sánchez Borroto, Y., Piloto Rodríguez, R., Goyos Pérez, L., & Ferrer Frontela, N. (2012). Predicción del número de cetano de biocombustibles a partir de su composición de ácidos grasos. *Ingeniería Mecánica*, 15(2), 147–157. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5081982>
- Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>
- Schulze, P. S. C., Guerra, R., Pereira, H., Schüller, L. M., & Varela, J. C. S. (2017). Flashing LEDs for microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 35(11), 1088–1101. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.011>

- Schulze, P. S. C., Pereira, H. G. C., Santos, T. F. C., Schueler, L., Guerra, R., Barreira, L. A., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2016). Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, 16, 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034>
- Shanklin, J., & Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 611–641. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.611>
- Sharma, T., Gour, R. S., Kant, A., & Chauhan, R. S. (2015). Lipid content in *Scenedesmus* species correlates with multiple genes of fatty acid and triacylglycerol biosynthetic pathways. *Algal Research*, 12, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.006>
- Srivastava, A., George, J., & Karuturi, R. K. M. (2018). Transcriptome analysis. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (Vol. 1, pp. 792–805). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20161-1>
- Song, Y., Wang, F., Chen, L., & Zhang, W. (2024b). Engineering Fatty Acid Biosynthesis in Microalgae: Recent Progress and Perspectives. *Marine Drugs*, 22(5), 216. <https://doi.org/10.3390/md22050216>
- Tan, K. W. M., & Lee, Y. K. (2016). The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. *Biotechnology For Biofuels*, 9(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0671-2>
- Timilsina, G. R., & Shrestha, A. (2011). How much hope should we have for biofuels? *Energy*, 36(4), 2055–2069. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.08.023>
- Tjørve, K. M. C., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*, 12(6), e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>
- Valverde, F., Romero-Campero, F. J., León, R., Guerrero, M. G., & Serrano, A. (2016). New challenges in microalgae biotechnology. *European Journal of Protistology*, 55, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.03.002>
- Wang, S., Wang, J., & Wang, H. (2022). Recent advances in enhancing microalgal lipid accumulation for biofuel production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1024441. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1024441>
- White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y. M., & Rock, C. O. (2005). The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 791–831. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524>

Yang, B., Liu, J., Jiang, Y., & Chen, F. (2017). Genetic engineering of the Calvin cycle for enhanced photosynthetic capacity in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 229. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0916-8>



Impact of blue and red light on lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*

José Juan Torres-Martínez¹ · Abner Martínez-Constantino¹ · Omar González-Ortega¹ · Elena Dibildox-Alvarado¹ · Ruth Elena Soria-Guerra¹

Received: 7 October 2024 / Revised: 13 December 2024 / Accepted: 18 December 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Microalgae can synthesize lipids under controlled settings, making them a viable option as biofuel feedstocks. However, optimizing culture parameters, such as light quality, to maximize lipid yields and achieve commercial viability remains challenging. This study examined the effects of blue and red light on the fatty acid profiles and lipid synthesis in two species with high biotechnological potential for biofuel production: *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. When grown under blue, red, and white light, these microalgae exhibited unique metabolic responses in terms of biomass increase, lipid content, and fatty acid composition. The expression levels of genes associated with lipid biosynthesis, including glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), β -ketoacyl-ACP synthase (KAS), Biotin carboxyl carrier protein-related gene (BCR), Stearoyl-ACP desaturase (SAD), 3-ketoacyl-ACP reductase (KAR), and Beta-carboxyltransferase 1 (BCX1) were analyzed. Blue light significantly increased lipid accumulation in both species, which was correlated with the overexpression of the GPAT and KAS genes. The generation of high-quality biofuel requires polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, especially oleic acid (C18:1) and palmitic acid (C16:0), which increased significantly after genetic activation. The increase in oleic acid levels under blue light in *C. vulgaris*, along with the simultaneous increase in oleic and linoleic acids (C18:2) in *S. acutus*, demonstrates these metabolic adaptations by the microalgae to optimize lipid synthesis under different light conditions. This study examines how blue and red light affects the growth, lipid accumulation, and gene expression of biofuel-potential microalgae *C. vulgaris* and *S. acutus*. We want to optimize light quality for microalgae biofuel precursor generation by evaluating photobiological reactions under regulated light settings. Previously, light quality has been shown to affect photosynthetic efficiency and metabolic pathways, but this study examines gene-level responses to lipid production under blue and red light. The findings show how tailored light conditions can improve lipid biosynthesis gene expression, which directly affects biodiesel fatty acid profiles.

Keywords Biofuels · Fatty acids · Gene expression · LED light · Lipid production · Microalgae · Chlorophyceae

Introduction

Due to their high lipid yield and CO₂ sequestration potential, microalgae are becoming valuable bioresources for sustainable energy production. These photosynthetic organisms can fix 200 times more CO₂ on a areal basis than trees, helping to combat climate change while also harboring commercially valuable molecules (Morais Junior et al. 2020). This dual

potential makes microalgae attractive for both environmental and economic sustainability. Their low nutritional needs, minimal space requirements, and climate resistance make them ideal for cultivation. Microalgae can thrive in varied conditions due to their metabolic adaptability, making them excellent for large-scale production (Li et al. 2023). Studies show that microalgae, such as *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* spp., produce key fatty acids like palmitic (C16:0), oleic (C18:1), and linoleic (C18:2) acids, which enhance biodiesel viscosity and oxidative stability (critical factors for meeting industrial standards) (Pekkoh et al. 2024).

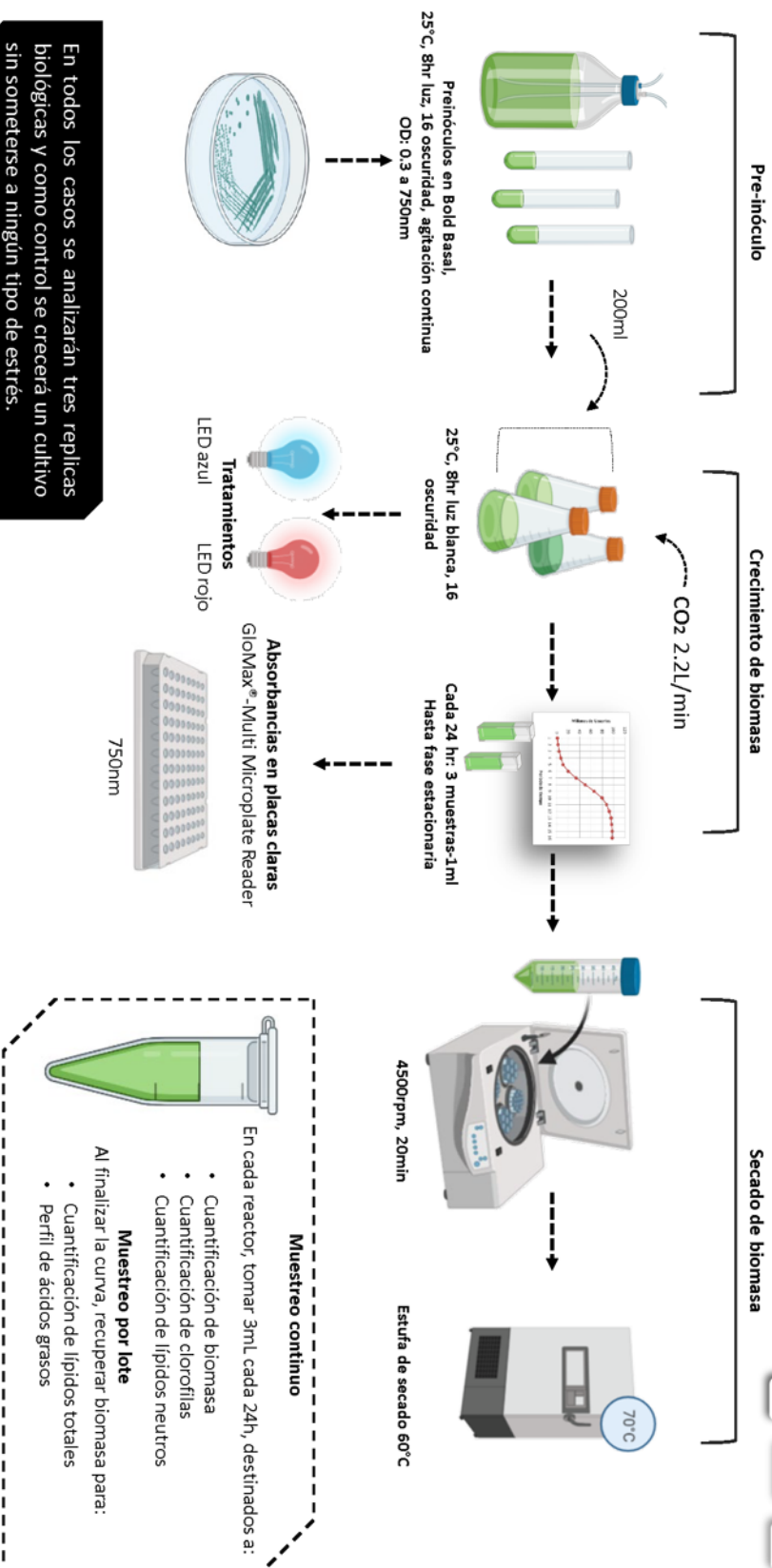
The lipid production in these species is significantly influenced by light and nutrient availability. Controlled nitrogen

✉ Ruth Elena Soria-Guerra
ruth.soria@uaslp.mx

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, Av. Dr. Manuel Nava 6, 78210 San Luis Potosí, Mexico

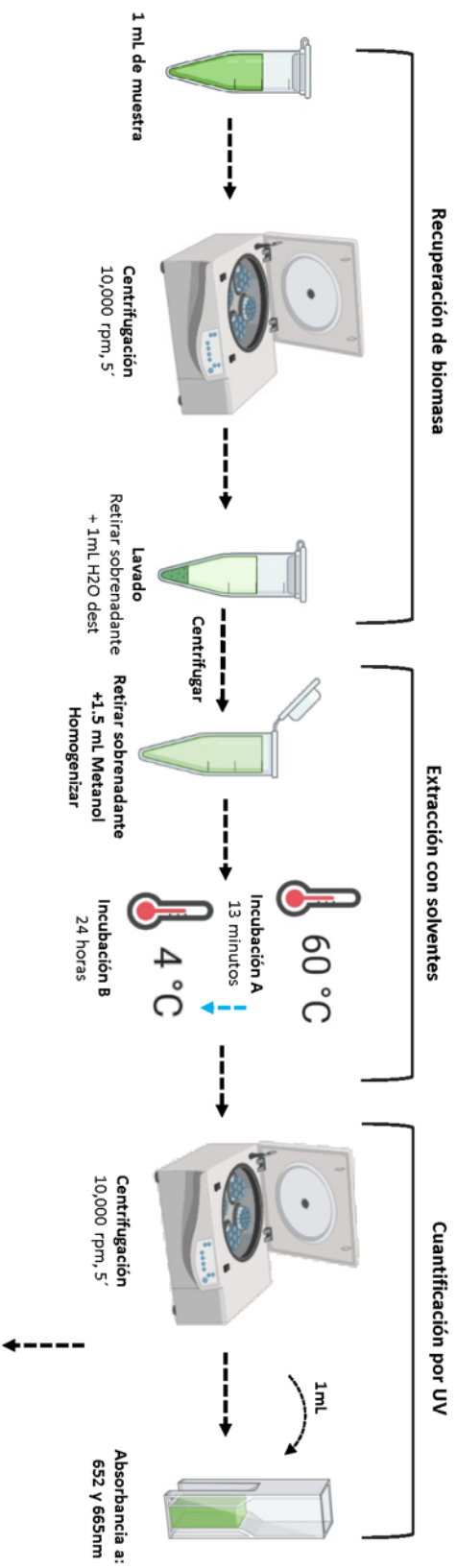


Propagación de las cepas de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus. acutus*





Cuantificación de clorofila en microalgas

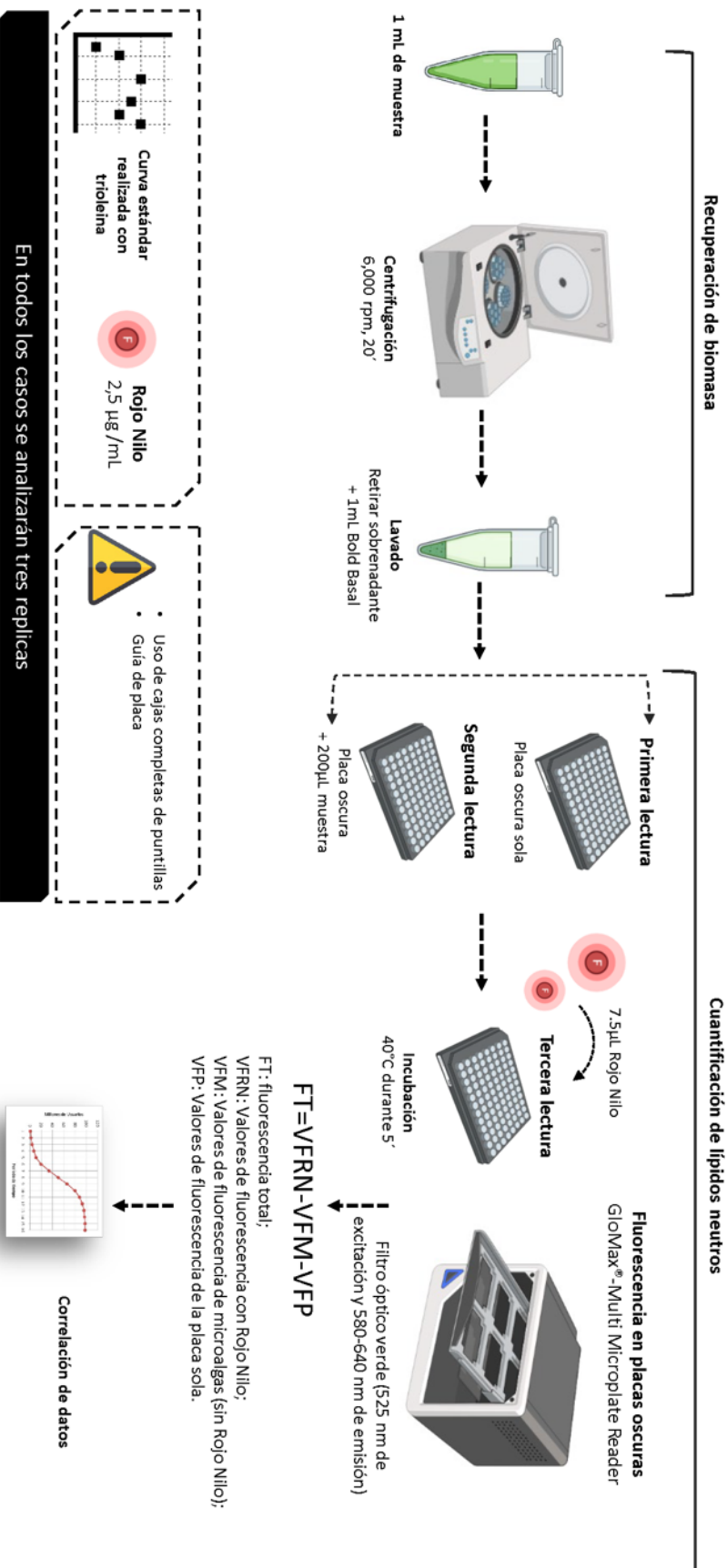


- Cambiar etiquetas a tubos perforados
- Dejar puntas en tubos solos (durante calentamiento)
- Regresar etiquetas a tubos solos
- Recuperación de parte superior

En todos los casos se analizarán tres replicas



Quantificación de lípidos neutros

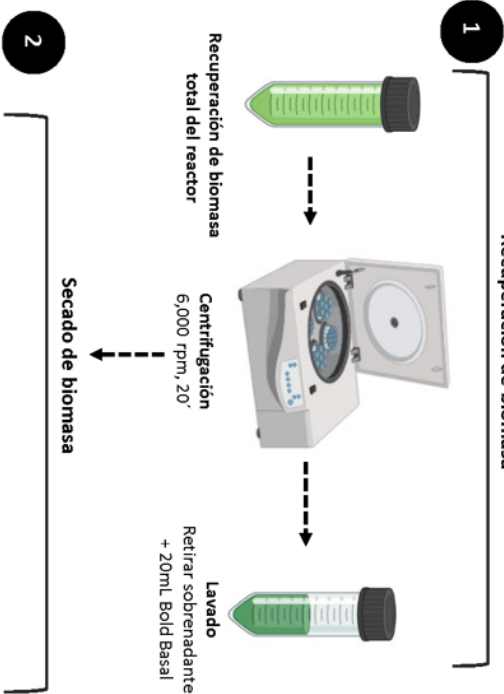




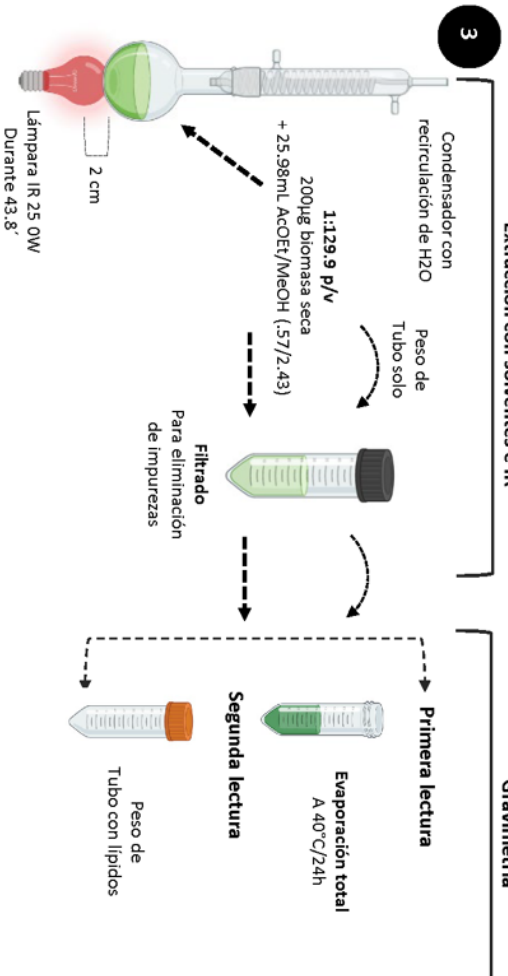
Extracción de lípidos totales por radiación infrarroja (IR)



Recuperación de biomasa



Extracción con solventes e IR



$$\text{Rendimiento de lípidos} = \frac{\text{peso de aceite extraído (g)}}{\text{peso de biomasa seca (g)}} (100)$$



- Uso de googles oscuros durante la extracción
- Los lavados se pueden realizar con diclorometano

En todos los casos se analizarán tres replicas