



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO, PURIFICACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL
DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

GLORIA VARGAS ROMERO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. HÉCTOR VICENTE MIRANDA ASTUDILLO



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO
(FES IZTACALA), 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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 la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HONORABLE JURADO

DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS MADRID

DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA

DR. HÉCTOR VICENTE MIRANDA ASTUDILLO

BIOL. ANABEL RUÍZ FLORES

DR. EDGAR MORALES RÍOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de “Bioenergética de Microalgas” del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la dirección del Dr. Héctor Vicente Miranda Astudillo.

La realización del proyecto fue apoyada por el donativo PAPIIT: IA204122 (DGAPA, UNAM) y el programa institucional “Producción de Biomoléculas de interés biomédico en microorganismos” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se agradece la ayuda técnica del E. en B. Marco Antonio Ortiz Jiménez en la realización del presente trabajo.

Índice de Contenidos

I. Introducción	7
Mitocondria. Origen	7
Mitocondria. Características y función	8
Cadena Transportadora de Electrones (CTE).....	8
NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)	11
Las microalgas	17
La diatomea <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	17
II. Justificación	20
III. Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
IV. Diseño experimental	22
V. Materiales y métodos	23
VI. Resultados	27
Crecimiento	27
Rompimiento	30
Preparación de membranas totales	32
Extracción de los complejos respiratorios	36
Purificación del complejo I	39
Composición polipeptídica del Complejo I de <i>P. tricornutum</i>	40
VII. Discusión	50
VIII. Conclusiones	55
IX. Referencias	56
X. Anexos	64
Anexo I. Soluciones y protocolos	64
Anexo II. Secuencias identificadas por espectrometría de masas	79
Anexo III. Artículo publicado	84

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de la estructura de la mitocondria	9
Figura 2. Proceso de fosforilación oxidativa.	11
Figura 3. Representación de los tres módulos que conforman al complejo I.	13
Figura 4. Subunidades que conforman al complejo I mitocondrial	13
Figura 5. Funciones catalíticas del complejo I.....	14
Figura 6. Propuesta del cambio conformacional en el complejo I.....	15
Figura 7. Esquema de la célula de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18
Figura 8. Diagrama de la optimización del cultivo de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	22
Figura 9. Esquema del fotobiorreactor Antares I	28
Figura 10. Crecimiento de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> en el fotobiorreactor Antares I.....	28
Figura 11. Imagen del cultivo de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> expuesto a diferente luz.....	29
Figura 12. Efecto de la luz en la producción de pigmentos en <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	31
Figura 13. Rompimiento de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con mortero	32
Figura 14. Rompimiento de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con perlas de vidrio.....	33
Figura 15. Rompimiento de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con ultrasonido.....	34
Figura 16. Comparación de las membranas totales de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> extraídas con tres métodos de rompimiento diferentes	35
Figura 17. Crecimiento mixotrófico de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	36
Figura 18. Extracción de las proteínas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con diferentes detergentes.....	38
Figura 19. Zimograma de los complejos mitocondriales de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39
Figura 20. Masa molecular estimada para la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ...	41
Figura 21. Purificación del complejo I mitocondrial de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mediante cromatografía líquida (FPLC).....	42
Figura 22. Resolución 3D de los péptidos que constituyen la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	43
Figura 23. Resolución polipeptídica de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> por espectrometría de masas.....	48
Figura 24. Identificación de las subunidades del complejo I de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> con respecto a otros linajes	49
Figura 25. Modelo estructural por homología de los complejos I y V de la fosforilación oxidativa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	54

Resumen

La NADH:ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial es el complejo de membrana más grande presente en la cadena respiratoria. Estructuralmente, esta enzima consta de un dominio membranal involucrado en la translocación de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, y un dominio periférico que sobresale hacia la matriz mitocondrial implicado en el proceso de transferencia de electrones provenientes de la oxidación del NADH. Históricamente, el complejo I mitocondrial ha sido estudiado y caracterizado a detalle a partir de organismos modelo como *Bos taurus* y *Yarrowia lipolytica*. Sin embargo, con la reciente inclusión de las microalgas al estudio de los complejos bioenergéticos como *Polytomella parva* y *Euglena gracilis* se han descrito estructuras divergentes con dominios adicionales.

En el grupo de las diatomeas, se ha descrito una cooperación importante entre la respiración mitocondrial y la fotosíntesis para el intercambio de equivalentes reductores. A pesar de ello, hasta el momento no se ha descrito para este grupo la estructura de ningún complejo involucrado en la fosforilación oxidativa. En el presente trabajo mostramos la optimización del cultivo de *Phaeodactylum tricorutum* en condiciones de laboratorio, así como, la purificación y caracterización del complejo I mitocondrial de esta especie.

Los resultados mostraron que el crecimiento de *P. tricorutum* en un fotobiorreactor Antares I con luz verde aumentó tres veces más respecto al crecimiento con luz blanca, lo que implica una mejora en la producción de biomasa. La obtención de membranas totales y posterior solubilización de las mismas con el detergente no iónico beta dodecil maltósido permitieron la identificación por actividad de NADH/NBT de dos bandas correspondientes al complejo I, las cuales se analizaron por espectrometría de masas cuantitativa (LC-ESI-Q-TOF-MS). Con este análisis se lograron identificar 20 péptidos pertenecientes al dominio membranal y periférico del complejo I en ambas bandas. Así mismo, se logró la primera purificación del complejo I de diatomeas mediante cromatografía líquida seguido de electroforesis nativa. En este caso, la composición polipeptídica se resolvió utilizando un sistema de geles en tres dimensiones que mostraron un perfil de 27 péptidos. En conjunto, los datos obtenidos sugieren que el complejo I de *P. tricorutum* es un complejo funcional más pequeño en comparación con lo reportado para otros organismos, que posee subunidades conservadas y el dominio anhidrasa carbónica.

I. Introducción

Mitocondria. Origen

Las mitocondrias son compartimentos celulares especializados en donde se llevan a cabo todas las reacciones metabólicas oxidativas, con excepción de la glucólisis, con el fin de producir energía aprovechable por las células en forma de adenosina trifosfato (ATP). Debido a que posee su propio sistema de membranas y un genoma individual, se considera que su origen en las células eucariotas fue mediante un proceso endosimbiótico (Margulis, 1971), es decir, que una célula huésped con núcleo adquirió la mitocondria al fagocitar a otra célula parecida al grupo de las alfa proteobacterias (Martin y Mentel, 2010).

El origen de este organelo se ha seguido con análisis filogenéticos para encontrar la relación más estrecha con los organismos actuales tanto del hospedero como del endosimbionte. Para generar una propuesta, se toma en consideración lo que pudo ser el fenotipo del primer endosimbionte mitocondrial y la naturaleza de la célula huésped, la interacción entre ambos y una aproximación al medio ambiente que rodeaba las primeras fases de la endosimbiosis mitocondrial, sin embargo, aún no está del todo claro cómo es que ocurrió el acoplamiento entre la célula huésped y el endosimbionte (Roger *et al.*, 2017).

La hipótesis más aceptada y respaldada con nuevos métodos sistemáticos, sugiere que existe una conexión filogenética estrecha con el grupo de las Rickettsiales, especialmente con aquellas Alfa-proteobacterias que se encuentran en los sedimentos marinos (Fan *et al.*, 2020). A su vez se propone que las proteínas mitocondriales específicas del procarionte son las que desempeñan un papel mayoritario en la bioenergética y la síntesis de proteínas, mientras que las proteínas mitocondriales eucariontes del hospedero funcionan principalmente como componentes de la membrana (Gray *et al.*, 2001). Sin embargo, la comparación de 20 Alfa-proteobacterias en rasgos aeróbicos, cardiolipina sintasa, proteínas ribosómicas y análisis filogenéticos, sugiere que el grupo de las Iodidimonas y taxones relacionados tienen una mayor coincidencia con el perfil metabólico de las proto mitocondrias que otras Alfa-proteobacterias (Geiger *et al.*, 2023).

Mitocondria. Características y función

La mitocondria tiene un tamaño aproximado de 0.5-1 μm de diámetro (Alberts *et al.*, 2002) y está formada por un sistema de doble membrana: una externa y una interna. La membrana externa es la que delimita el organelo y mantiene comunicación con el citoplasma de la célula, lo que quiere decir que tiene alta permeabilidad, mientras que la membrana interna forma pliegues denominados crestas creando dos espacios independientes en el interior del organelo: la matriz y el espacio intermembranal (Cooper, 2000).

Una de sus funciones principales es la de generar energía a través de un proceso acoplado conocido como Fosforilación Oxidativa (FO). Este proceso ocurre en la membrana interna mitocondrial y se divide en dos partes fundamentales, la primera de ellas es la Cadena Transportadora de Electrones (CTE), en la cual participan cuatro complejos proteicos enzimáticos membranales con función oxidorreductora; y la segunda es la Síntesis de ATP donde participa un quinto complejo llamado ATP sintasa (Lehninger y Wadkins, 1962), el cual también es importante para diferenciar la ultraestructura mitocondrial mediante el plegamiento y patrón de la membrana interna debido a la posición, estructura y estado oligomérico de la ATP sintasa, generalmente dimérica en los eucariotas descritos hasta la fecha (Miranda-Astudillo *et al.*, 2022).

En la matriz es donde se encuentra el material genético y también todo el conjunto de enzimas que participan en la oxidación de azúcares, grasas y proteínas. Es aquí donde ocurre la beta oxidación y el ciclo del ácido cítrico, también conocido como el Ciclo del Ácido Tricarboxílico (TCA) o Ciclo de Krebs, importante para la formación de equivalentes reductores como NADH y FADH₂ a través de la oxidación de acetil CoA a dióxido de carbono (Osellame *et al.*, 2012).

Cadena Transportadora de Electrones (CTE)

La cadena respiratoria o Cadena Transportadora de Electrones (CTE) se define como un conjunto de proteínas transportadoras de electrones que realizan un proceso multicomponente y están embebidas en la membrana interna mitocondrial. Estas proteínas también son llamadas complejos bioenergéticos y están formadas por diversos componentes que llevan a cabo reacciones de oxidoreducción (redox) que incluyen flavinas, proteínas de hierro-azufre, citocromos, ubiquinona e

iones metálicos (Whitehouse *et al.*, 2019). A continuación, la figura 1 describe la estructura general de la mitocondria indicando algunas de sus funciones.

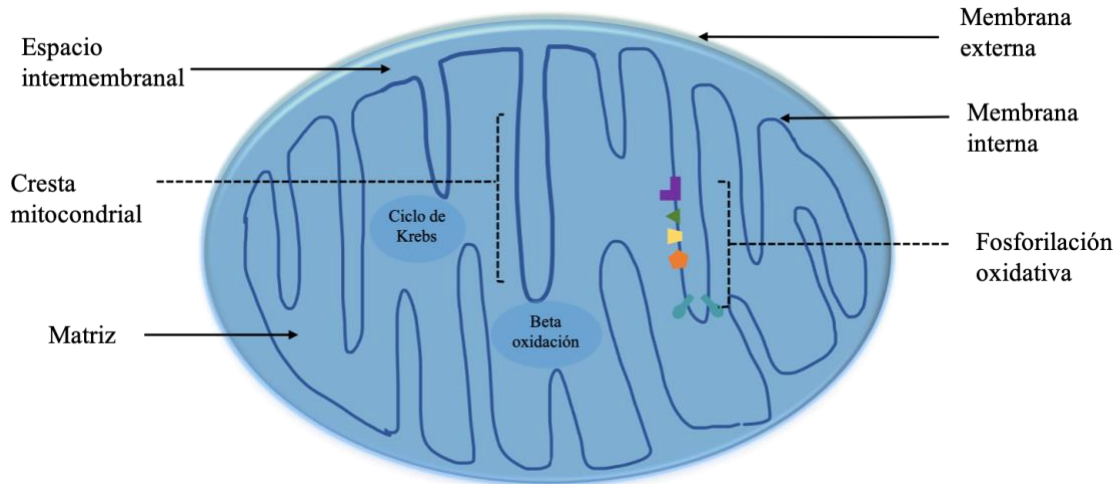


Figura 1. Esquema de la estructura de la mitocondria. La membrana externa delimita el organelo mientras que la membrana interna forma pliegues en el interior creando dos compartimentos independientes: la matriz y el espacio intermembranal. Cada uno de los pliegues delimita un compartimento independiente llamado cresta mitocondrial.

Complejo I, NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa. Es el complejo más grande de toda la cadena con un peso aproximado a 1 MDa, conformado por alrededor de 45 subunidades proteicas dispuestas en dos conjuntos principales denominados brazos, dispuestos en forma de L, lo que le da su forma característica al complejo (Sazanov y Walker, 2000). Uno de estos brazos está embebido en la membrana constituyendo la parte hidrofóbica que será encargada de traspasar $4H^+/2e^-$ desde la matriz hacia el espacio intermembranal. El otro de los brazos protruye sobre la membrana y es la parte hidrofílica encargada de las reacciones redox. Es en este brazo donde ocurre la primera entrada de electrones a la cadena que se obtienen a partir de la oxidación del NADH a NAD^+ proveniente del ciclo de Krebs. Estos electrones pasarán primero uno a uno al cofactor mononucleótido de flavina (MNF) y después a 8 grupos de hierro-azufre (Fe-S) dentro del mismo complejo, que luego serán entregados a la ubiquinona reduciéndola a ubiquinol para que sean llevados hacia el complejo III (Efremov *et al.*, 2010).

Complejo II o succinato deshidrogenasa. Con un peso de 140 kDa y sólo cuatro subunidades todas codificadas en el núcleo con tres centros hierro-azufre (Fullerton *et al.*, 2020); el complejo II contribuye con la transferencia de electrones hacia la ubiquinona, sin translocar protones de un lado a otro de la membrana, proporcionando un aporte de energía libre extra a la cadena. La reacción principal que sucede en este complejo es la oxidación del succinato a fumarato y a su vez reduce FAD^+ en FADH_2 , de donde obtienen los electrones que son llevados al complejo III. Al no participar en la traslocación de protones, se dice que es una enzima más relacionada con el ciclo de Krebs y no un componente como tal de la CTE (Whitehouse *et al.*, 2019).

Complejo III, complejo bc₁ o citocromo c reductasa. Es una enzima compuesta de 10-11 subunidades, pero sólo tres de ellas son las encargadas de las reacciones de oxido-reducción: el citocromo *b* (hemo *b_L* y hemo *b_H*) como única subunidad codificada en el genoma mitocondrial (Wallace *et al.*, 2013), el citocromo *c*₁ y la subunidad Rieske con dos centros hierro-azufre (Fe-S). El citocromo *c* sólo acepta un electrón a la vez por lo que el proceso se lleva en dos pasos (ciclo Q), que involucra la oxidación de ubiquinol (QH₂) y la reducción de ubiquinona. Para este proceso, los electrones llegan al citocromo *bc*₁, que luego son transferidos al citocromo *c* (estado reducido), el cual se encuentra por fuera de la membrana en el espacio intermembranal y su función es llevar los electrones al Complejo IV. La forma funcional de este complejo es un dímero, lo que implica un total de 22 subunidades con un peso total aproximado de 450 kDa (Cooper y Clark, 1994; Trumpower, 1990).

Complejo IV o citocromo c oxidasa. Es la última enzima componente de la CTE, está conformada por 11-14 subunidades. Tres de ellas forman el núcleo catalítico (COX1, COX2, COX3) y están codificadas por el ADN mitocondrial. Contiene iones de cobre involucrados en su función redox, además de zinc, magnesio y grupos hemo. La subunidad COX1 está involucrada en el bombeo de protones y COX2 es quien recibe al citocromo *c* en su centro CuA donde es oxidado y los electrones después son donados al oxígeno quien funge como último aceptor de electrones y es reducido en dos moléculas de agua (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

La transferencia de electrones lleva consigo un bombeo de protones a través de los complejos I, III y IV desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Esto genera un gradiente

electroquímico a través de la membrana interna que permite que los protones sean bombeados de regreso a la matriz por el complejo V impulsando la generación de ATP. En esta transferencia de electrones, el complejo I bombea 4 protones (H^+) desde la matriz al espacio intermembranal, el complejo III pasa $4H^+$ por cada $2e^-$ y el complejo IV bombea $2H^+$ por $4e^-$. La energía que se libera de las reacciones redox se conserva como un gradiente de pH y un potencial de membrana generado por la translocación de protones (Mitchell, 1961; 1966; Nelson *et al.*, 2017) (Figura 2).

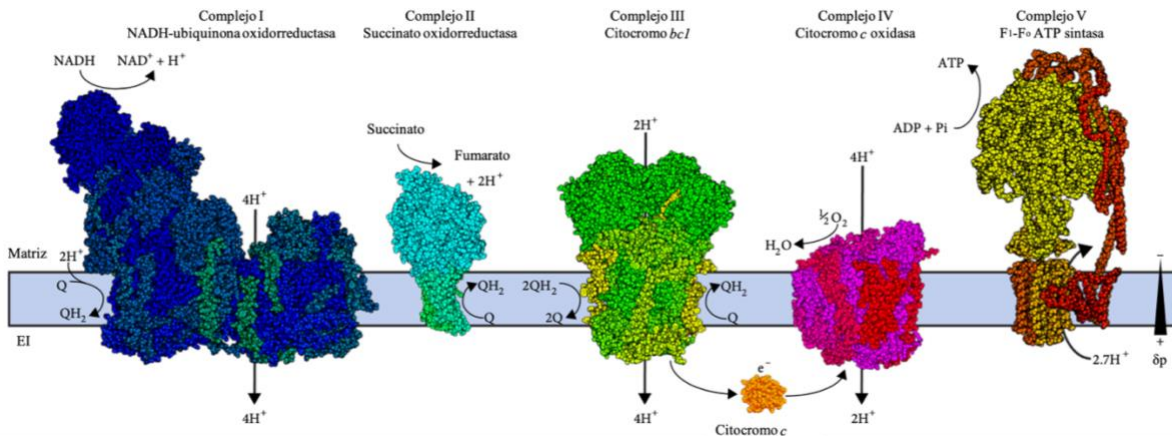


Figura 2. Proceso de fosforilación oxidativa. Se muestran las estructuras de los complejos mitocondriales de mamífero determinadas experimentalmente. De izquierda a derecha el Complejo I de ovino PDB 5LNK (Fiedorczuk *et al.*, 2016), Complejo II de porcino PDB 1ZOY (Sun *et al.*, 2005), Complejo III de bovino PDB 1NTM (Gao *et al.*, 2003), Complejo IV de bovino PDB 5B1A (Yano *et al.*, 2016) y Complejo V de bovino PDB 5ARA (Zhou *et al.*, 2015). Tomado y modificado de Letts y Sazanov, 2017.

NADH:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo I)

El complejo I es la primera entrada de electrones a la CTE a partir de la oxidación del NADH. También puede funcionar en reversa, utiliza la fuerza protón motriz para reducir NAD^+ . El sector periférico se encarga de las reacciones redox y se compone de dos módulos funcionales, un módulo de entrada de los electrones (módulo N) y uno de salida de electrones (módulo Q). El módulo N es el encargado de la oxidación del NADH y el módulo Q comprende el sitio de reducción de la ubiquinona. Los dos electrones que se obtienen del NADH se transfieren a través de mononucleótidos de flavina (FMN) y 8 grupos hierro-azufre (Fe-S) a la ubiquinona. El sector

membranal (módulo P) se encarga de la translocación de protones mediante cambios conformacionales en la enzima que simulan un pistón (Mimaki *et al.*, 2012) (Figura 3).

Hasta ahora el complejo I más pequeño es el de bacterias con 14 subunidades descritas como Nuo1 a Nuo14 y un peso de 550 kDa (Yagi *et al.*, 1993). En los eucariontes se han encontrado las mismas 14 proteínas homologas (conservadas), además de otras 32 subunidades llamadas supernumerarias que rodean al “núcleo” con la función de proporcionar estabilidad estructural al complejo y participar en su biogénesis, que parece ser bastante compleja por la gran cantidad de subunidades que lo conforman y la codificación de las mismas por ADN mitocondrial y nuclear (Friedrich y Böttcher, 2004).

Sin embargo, no siempre se sigue la regla 31 más 14, se ha observado que el número de subunidades cambia entre especies. En el caso de bovino (*Bos taurus*), su complejo I está conformado por un total de 45 subunidades (970 kDa) y es la referencia por excelencia al ser el primer acercamiento a la estructura del complejo con cristales 2D (Boekema *et al.*, 1982). En *Arabidopsis thaliana* (47 subunidades) y *Polytomella parva* (51 subunidades), por ejemplo, se ha encontrado un heterotrímero de anhidrasa carbónica gamma (AC γ) que representa un dominio adicional expuesto a la matriz (Klusck *et al.*, 2021). En la tabla 1 se resumen las subunidades de algunas especies representativas con su correspondiente nomenclatura y equivalencia entre ellas.

Posterior a la descripción de la primera estructura del complejo I de bovino y la consecuente secuenciación del genoma mitocondrial humano se identificaron las 45 proteínas homologas en *Homo sapiens* y fueron nombradas con una nomenclatura específica. Las subunidades codificadas por ADN nuclear se nombraron con el prefijo “NDU” y aquellas codificadas por el ADN mitocondrial se agregó el prefijo “ND” (Mimaki *et al.*, 2012) (Figura 4).

Las subunidades codificadas por ADN mitocondrial corresponden a 7 péptidos hidrofóbicos: ND1 es el sitio de unión de la ubiquinona, junto con ND6 y NDL4 forman el canal E, mientras que ND2, ND4 y ND5 funcionan para el bombeo de protones (Sazanov y Walker, 2000). Aquellas subunidades hidrofílicas codificadas por el núcleo contienen la FMN para oxidar al NADH (subunidad 51 kDa), los grupos Fe-S para la transferencia de electrones (subunidad 75 kDa), la

subunidad 24 kDa que interacciona con la de 75 y 51 kDa, las subunidades 30 y 49 kDa, PSST y TYKY (Sazanov y Hinchliffe, 2006) (Figura 5).

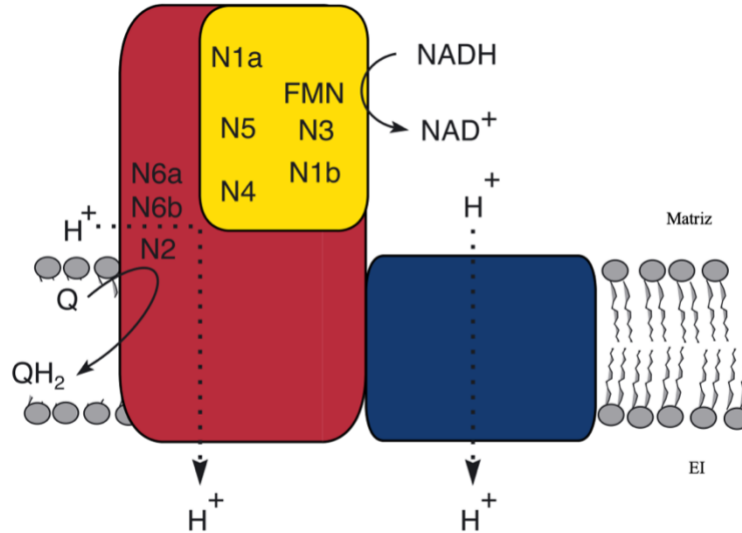


Figura 3. Representación de los tres módulos que conforman al complejo I. En amarillo el módulo N con los centros Fe-S, en rojo el sitio de unión de la quinona (módulo Q) y en azul el módulo de transporte (módulo P). Tomado de Friedrich y Böttcher, 2004.

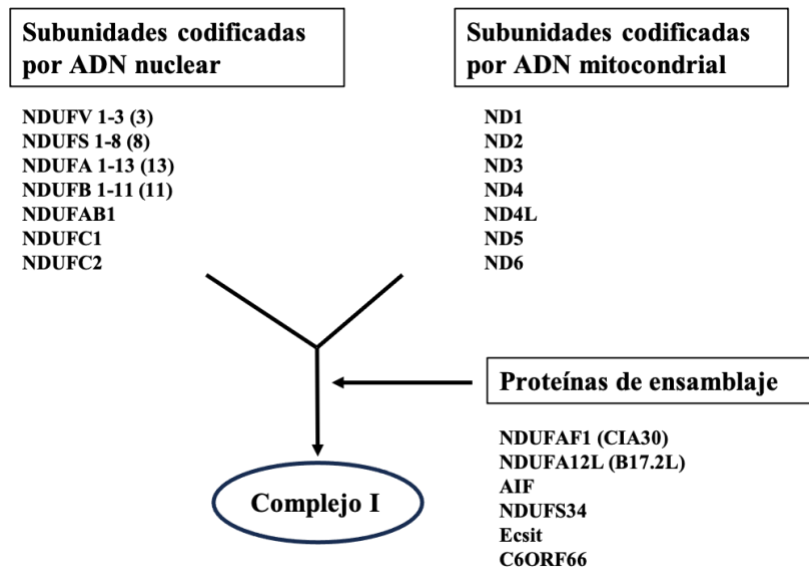


Figura 4. Subunidades que conforman al Complejo I mitocondrial de mamífero (*Homo sapiens* y *Bos taurus*) separadas en aquellas codificadas por el ADN mitocondrial, las codificadas por el ADN nuclear y las que participan en el ensamblaje. Tomado de Sharma *et al.*, 2009.

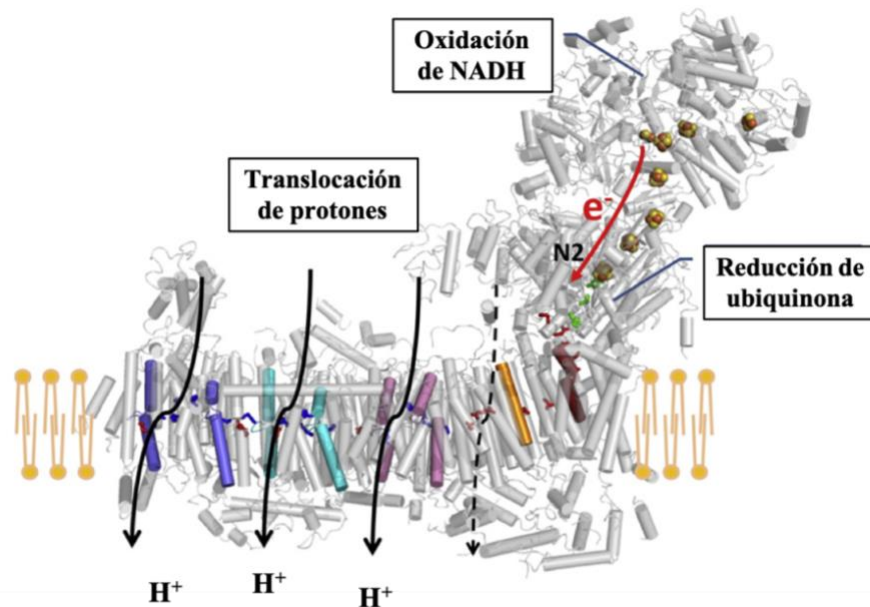


Figura 5. Funciones catalíticas del Complejo I. Transferencia de electrones desde el sitio de oxidación del NADH al sitio de reducción de la ubiquinona a través de los centros Fe-S. En el brazo membranal se indican las subunidades antiportadoras (ND5, morado; ND4, cian; ND2, rosa; ND6 naranja). La flecha punteada indica otra vía de translocación de protones a través de las subunidades ND2 y NDL4. Tomada de Wirth et al., 2016.

Una forma de elucidar el funcionamiento del complejo I ha sido a través del uso de mutantes e inhibidores de origen natural o sintético. Los inhibidores se han clasificado de acuerdo a su forma de acción en el complejo I en tres grupos. Los de tipo A que incluye aquellos que actúan como un antagonista de quinona y actúa en la entrada del sitio hidrofóbico (piericidina A); los antagonistas de semiquinona o de tipo B que actúan en el paso intermedio como la rotenona, el inhibidor clásico de complejo I, y los de tipo C o antagonistas de quinol que actúan en la liberación de producto (mixotiazol) (Sharma *et al.*, 2009; Degli Esposti, 1998).

En el complejo I se han descrito cambios conformacionales impulsados principalmente por reacciones redox de quinonas para producir el acoplamiento entre la transferencia de electrones y la translocación de protones, los cuales se encuentran físicamente separados por una distancia de 200 Å (Sazanov, 2015). Con experimentos *in vitro* se ha observado que los cambios conformacionales son inducidos por la fuerza iónica del amortiguador y que estos movimientos

son reversibles. La conformación en forma de L que le da la forma característica al complejo está presente con una fuerza iónica alta; en cambio, con una fuerza iónica baja el complejo adopta una conformación con ambos brazos más cerca entre ellos parecido a una herradura (Böttcher *et al.*, 2002).

El cambio en el ángulo entre el sector periférico y el sector membranal origina lo que se ha descrito como estado 1 y estado 2: conformación abierta y cerrada. Como la translocación de protones se produce a través de ondas electrostáticas se ha propuesto un modelo electrostático-conformacional mixto que explica el acoplamiento entre ambos sectores basado en tres premisas: los cambios inducidos por NADH en la cavidad de la quinona ocurren en la conformación abierta, la ubiquinona es reducida sólo en el estado cerrado, y el bombeo de protones se lleva a cabo durante las transiciones entre los dos estados (Kampjut y Sazanov, 2020) (Figura 6).

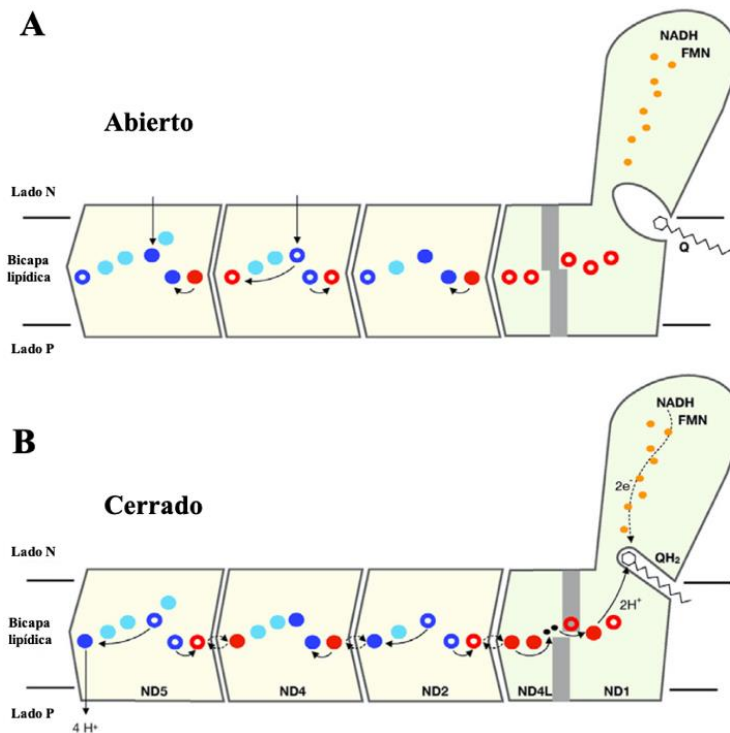


Figura 6. Propuesta del cambio conformacional en el complejo I. A Estado abierto. El sitio de unión de la ubiquinona está abierto para permitir su libre ingreso con la rotación de la subunidad ND6 (color gris). B Estado cerrado. La ubiquinona está completamente unida al complejo y recibe los electrones de los centros Fe-S, lo que lleva a una reubicación de protones para ser expulsados por interacciones electrostáticas. Tomado y modificado de Kampjut y Sazanov, 2022.

Tabla 1. Subunidades de Complejo I de diferentes especies.

Subunidades	<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Núcleo	NDUFS1	75-kDa	NUAM	Nqo3	NUOS1
	NDUFV1	51-kDa	NUBM	Nqo1	NUO6
	NDUFS2	49-kDa	NUCM	Nqo4	NUO7
	NDUFS3	30-kDa	NUGM	Nqo5	NUO9
	NDUFV2	24-kDa	NUHM	Nqo2	NUO5
	NDUFS8	TYKY	NUIM	Nqo9	NUO8
	NDUFS7	PSST	NUKM	Nqo6	NUO10
	ND1	ND1	NU1M	Nqo8	ND1
	ND2	ND2	NU2M	Nqo14	ND2
	ND3	ND3	NU3M	Nqo7	ND3
	ND4	ND4	NU4M	Nqo13	ND4
	ND5	ND5	NU5M	Nqo12	ND5
	ND6	ND6	NU6M	Nqo10	ND6
	ND4L	ND4L	NULM	Nqo11	ND4L/NUO11
Supernumerarias	NDUFA2	B8b	NI8M		NUOB8
	NDUFS4	AQDQ/18-kDa	NUYM		NUOS4
	NDUFS6	13-kDa	NUMM		NUOS6
	NDUFA12	B17.2	N7BM		NUO13
	NDUFA7	B14.5a	NUZM		Cre12.g484700
	NDUFA5	B13	NUFM		NUOB13
	NDUFA9	39-kDa	NUEM		NUOA9
	NDUFA6	B14	NB4M		NUOB14
	NDUFAB1	SDAP	ACPM1-ACPM2		ACP1
	NDUFA1	MWFE	NIMM		NUOA1
	NDUFA3	B9	NI9M		Cre12.g537050
	NDUFA8	PGIV	NUPM		NUOA8
	NDUFA11	B14.7	NUJM		TIM17/TIM22
	NDUFA13	B16.6	NB6M		NUOB16
	NDUFS5	PFFD/15-kDa	NIPM		NUOS5
	NDUFB3	B12	NB2M		NUOB12
	NDUFB4	B15	NB5M		NUOB4
	NDUFB7	B18	NB8M		NUOB18
	NDUFB8	ASHI	NIAM		TEF29
	NDUFB9	B22	NI2M		NUOB22
	NDUFB10	PDSW	NIDM		NUOB10
	NDUFB11	ESSS	NESM		NUO17
	NDUFV3	9-kDa			-
	NDUFC1	KFYI			Cre17.g725400
	NDUFC2	B14.5b			NUOP1
	NDUFA10	42-kDa			-
	NDUFB1	MNLL			NUO21
	NDUFB2	AGGG			-
	NDUFB5	SGDH			-
	NDUFB6	B17			-
				NUXM	
			NEBM		
			NUNM		
			NUUM		
			ST1		
				NQO15	
				NQO16	
					CAG1
					CAG2
					CAG3
					TIMM22A
					NUOP3
					NUOP4
					NUOP5

Las microalgas

Las microalgas son organismos acuáticos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y son filogenéticamente más diversas que los animales y las plantas terrestres. Han sido clasificadas en divisiones basadas en el tipo de pigmentos, la química de los productos fotosintéticos, la organización de los tilacoides y otras partes estructurales del cloroplasto, la estructura de la pared celular y las características del flagelo si es que presentan (Borowitzka, 2018). Actualmente podemos encontrar miembros de este grupo dentro de la mayoría de los linajes de eucariontes con excepción del grupo Amorphea que incluye a los linajes Opisthokonta y Amoebozoa. Son eucariontes erróneamente catalogados como protistas, recientemente distribuidas en 7 supergrupos que reflejan mejor la gran diversidad de Eukarya (Burki *et al.*, 2020).

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum*

Las diatomeas son el grupo más rico en especies de algas autótrofas. Su supervivencia a diversos eventos geológicos demuestra el éxito adaptativo que han tenido y su extensa proliferación en aguas dulces, salobres y marinas, convirtiéndolas en un eslabón primario importante en toda la tierra para el ciclo del carbono y oxígeno contribuyendo hasta con un 40% de la producción primaria global (Benoiston *et al.*, 2017). Las diatomeas se reconocen fácilmente por la construcción de una pared celular, formada a partir de dos mitades superpuestas (tecas) compuestas de silicio y una serie de tiras delgadas en los laterales (bandas de cintura). Las diatomeas se pueden separar ampliamente en dos grupos, las pinnadas, que son bilateralmente simétricas, y las céntricas, que son radialmente simétricas (Mann *et al.*, 2016).

Dentro de las diatomeas pinnadas se encuentra *Phaeodactylum tricornutum*, una diatomea marina que presenta diferentes fenotipos (ovalada, fusiforme y trirradiada) dependiendo de las condiciones ambientales es capaz de cambiar de una forma a otra con el tiempo (Borowitzka y Volcani, 1978; De Martino *et al.*, 2007). *P. tricornutum* fue la primera diatomea en modificarse genéticamente con éxito (Zaslavskaja *et al.*, 2001) lo que abrió paso a la secuenciación y registro de su genoma (Bowler *et al.*, 2008), convirtiéndola en un modelo conveniente para los estudios de nuestro grupo.

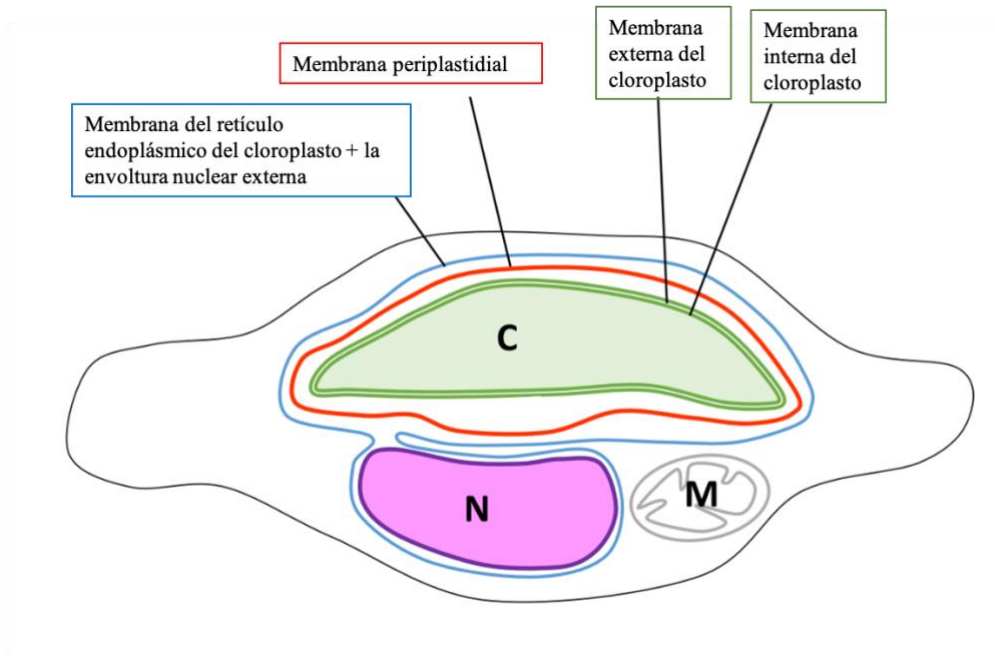


Figura 7. Esquema de la célula de *Phaeodactylum tricorutum* en el que se muestra el cloroplasto secundario delimitado por cuatro membranas (C), el núcleo (N) y la mitocondria (M). Tomada y modificada de Flori *et al.*, 2016.

Contrario a otras diatomeas, *P. tricorutum* es una especie que no requiere de sílice para crecer o dividirse de forma asexual y como consecuencia no se ha observado reproducción sexual en este organismo, permitiendo así un fácil cultivo y mantenimiento fácil de la misma (Lewin *et al.*, 1958). Su pared celular está formada en su mayoría por compuestos orgánicos que le proporcionan la plasticidad necesaria para cambiar de forma, aunque la forma habitual es fusiforme (Tesson, 2009).

Otra característica importante es que presenta crecimiento fotoautótrofo y mixotrófico, combinando de manera simultánea la conversión de energía tanto del cloroplasto como de la mitocondria (Villanova *et al.*, 2021). Ambos organelos son alargados y ocupan gran parte del espacio interno de la célula; el cloroplasto es de tipo secundario y está rodeado por 4 membranas que lo envuelven (Flori *et al.*, 2016), producto de dos eventos endosimbióticos, primero con un alga verde y luego con un alga roja (Prihoda *et al.*, 2012) (Figura 7).

El crecimiento mixotrófico de *P. triornutum* es de interés biotecnológico por su capacidad productora de biomoléculas, por lo que gran parte de los estudios en esta diatomea se han concentrado en el incremento de lípidos en la célula y en una mayor eficiencia fotosintética (Bluter *et al.*, 2020). Sin embargo, aún falta profundizar en la estructura y fisiología de otros organelos como la mitocondria; similar al cloroplasto por ser una máquina productora de energía aprovechable para la célula en forma de ATP, encargada de realizar todas las reacciones metabólicas oxidativas, con excepción de la glucólisis en la mayoría de los eucariontes (Cooper, 2000). En *P. triornutum* se ha demostrado una cooperación energética estrecha entre mitocondria y cloroplasto al intercambiar ATP/NADPH principalmente para impulsar la fijación de carbono y el crecimiento (Bailleul *et al.*, 2015).

II. Justificación

Los estudios en el campo de la bioenergética se han centrado en su mayoría en los linajes de animales y plantas que sobresalen por su aprovechamiento, sin embargo, existen otros grupos de organismos como las microalgas en las cuales se requiere ampliar la línea de investigación, modificar su clasificación y crear nuevas estrategias para su estudio debido a que en el pasado la mayoría de sus características descritas fueron erróneamente etiquetadas como “atípicas” al ser distintas a las reportadas para los organismos correspondientes a los modelos clásicos, principalmente del grupo Opisthokonta. En el caso de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* únicamente se ha caracterizado su cloroplasto, pero falta describir más sobre su biología general y en específico sobre la estructura y funcionamiento de su maquinaria mitocondrial. Es por eso que este trabajo se pretende profundizar en la caracterización de los complejos bioenergéticos mitocondriales, en específico del complejo I.

III. Objetivo general

Optimizar el cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* para caracterizar su complejo I mitocondrial (NADH:ubiquinona oxidorreductasa).

Objetivos específicos

1. Optimizar las condiciones de cultivo de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* en el laboratorio.
2. Optimizar las condiciones de rompimiento de las células.
3. Preparar membranas totales de *Phaeodactylum tricornutum* mediante centrifugación diferencial.
4. Extraer los complejos membranales utilizando detergentes no iónicos y posterior separación mediante electroforesis azul en geles de acrilamida en condiciones nativas.
5. Identificar la actividad del complejo I mitocondrial de *Phaeodactylum tricornutum* directamente en el gel de poliacrilamida.
6. Purificar el complejo I mitocondrial de *Phaeodactylum tricornutum* por cromatografía líquida de baja presión (FPLC).
7. Resolver el patrón polipeptídico del complejo I purificado en un sistema de geles 3D-BN/SDS/SDS.
8. Identificar las subunidades presentes en el complejo I mitocondrial de *P. tricornutum*.

IV. Diseño experimental

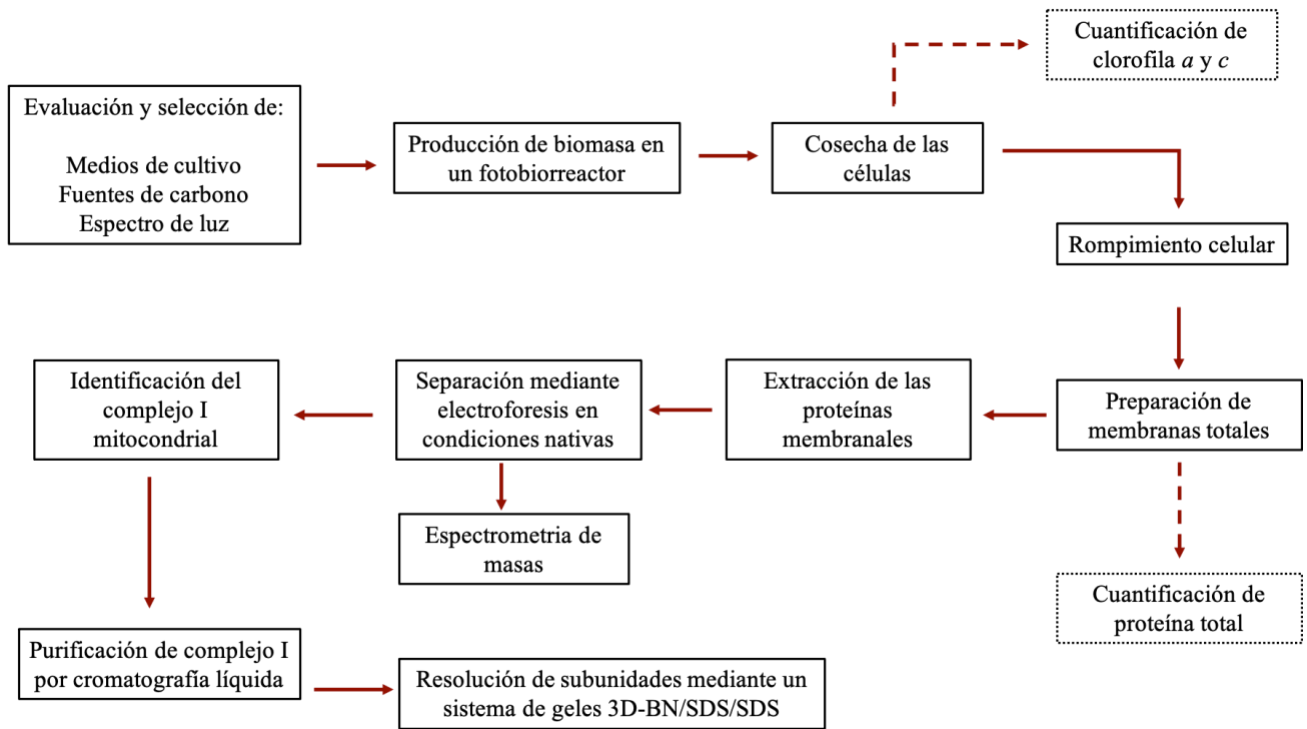


Figura 8. Diagrama de la optimización del cultivo de *Phaeodactylum tricorneratum* y caracterización de su complejo I mitocondrial.

V. Materiales y métodos

Para los protocolos detallados consultar la sección Anexos

1. Crecimiento

Phaeodactylum tricornutum Pt1 8.6 (CCMP 2561) fue crecida en un fotobiorreactor Antares I con las siguientes condiciones: temperatura 18 °C, fotoperiodo 12/12 h, aireación constante a través de un filtro PVFD de 0.22 µm (Corning), medio de cultivo F/2 (33 g/L Instant Ocean, 1 ml/L NaNO₃, 1 ml/L NaH₂PO₄ H₂O, 1 ml/L oligoelementos (Guillard, 1975) y medio ESAW (Enriched Sea Water Medium) (Berges *et al.*, 2001), adicionados con vitaminas (biotina 10⁻⁷%, vitamina B12 10⁻⁷% y vitamina B1 2×10⁻⁵% (p/v)). Las células se cosecharon en la fase logarítmica mediante centrifugación a 2,195 xg durante 10 minutos en una centrifuga VELAB PRO-8M. Para determinar la fase de crecimiento de los cultivos se realizaron curvas de crecimiento con el método de conteo de células con una cámara de Neubauer de doble recuento utilizando un microscopio óptico CH-2 (Olympus).

2. Cuantificación de clorofila *a*, *c*₁ + *c*₂ y carotenos

Se tomó una muestra de 10 mL de un cultivo a mitad de la fase logarítmica de crecimiento. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 2,195 xg durante 10 minutos. El botón de células se resuspendió en 1 mL de metanol absoluto y se dejó reposando una noche en oscuridad a 4°C. Luego, la muestra se centrifugó a 13,100 xg durante 10 minutos para separar las células del extracto con los pigmentos. Se midió la absorbancia del sobrenadante de 400 a 800 nm con un espectrofotómetro Agilent CARY 60 UV-Vis. La cuantificación de clorofila *a* y *c*₁ + *c*₂ se realizó tal como lo describe Ritchie (2006) y Strickland y Parsons (1972) para la concentración de carotenos.

3. Rompimiento y preparación de membranas totales

Los pasos siguientes se realizaron siempre a 4°C. El botón resultante fue resuspendido en amortiguador SHE (Sacarosa 0.25 M, EDTA 6 mM, HEPES 50 mM; pH 7.2). Se probaron diferentes métodos para romper las células como trituración con mortero, perlas de vidrio (0.5 mm de diámetro), ultrasonido y prensa de French. Después del tratamiento de rompimiento, la muestra

se centrifugó a 680 *xg* durante 10 minutos para separar los restos celulares y algunas células completas. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó a 13,100 *xg* durante 20 minutos para obtener el botón correspondiente a las membranas. El botón final se lavó con amortiguador SHE y fue almacenado a -70°C hasta su uso. La cuantificación de proteína total de la preparación de membranas se hizo mediante el método de Bradford (Bio-Rad).

4. Extracción de los complejos respiratorios

Las proteínas membranales fueron solubilizadas con diferentes detergentes no iónicos: β -dodecil maltósido (β -DDM), α -dodecil maltósido (α -DDM), glico-diosgenina (GDN101, Anatrace), Tween-20, Tritón X-100 y digitonina (Sigma); con amortiguador de solubilización (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, glicerol 10%, ácido aminocaproico 50 mM; pH 8.4). Posterior a una centrifugación para remover la parte insoluble, los complejos extraídos fueron resueltos mediante electroforesis en condiciones nativas (clara y azul nativa) con geles de gradiente de poliacrilamida (Wittig *et al.*, 2007).

5. Zimografía en gel

La identificación del complejo I mitocondrial se realizó directamente en gel de acuerdo con lo descrito por Witting y Schägger, (2005) y Zerbetto *et al.*, (1997), con algunas modificaciones. Para evidenciar este complejo se empleó NADH y nitroazul de tetrazolio (NBT) para revelar la actividad de NADH oxidorreductasa mediante la formación de un precipitado morado (formazán) en Tris 100 mM; pH 7.0. Adicionalmente se realizó la búsqueda de otros complejos de la fosforilación oxidativa, en el caso del complejo V o ATP sintasa se siguió la hidrólisis de ATP asociada a la formación de un precipitado de plomo en un amortiguador de glicina 270 mM, Tris 35 mM, ATP 8 mM, MgSO₄·7H₂O 14 mM y 0.2% Pb(NO₃)₂; pH 8.4. La tinción de actividad de citocromo *c* oxidasa se realizó mediante la precipitación de óxidos de 3,3 β -diaminobencidina en un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, con citocromo *c* de corazón de caballo; pH 7.4. En el caso del complejo III, se realizó la tinción de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina-H₂O₂) para detectar la actividad de peroxidasa asociada a grupos hemo, de acuerdo con lo descrito por Thomas *et al.*, (1976).

6. Purificación de Complejo I (NADH deshidrogenasa)

Separación por cromatografía de intercambio aniónico: Se solubilizaron membranas totales (160 mg de proteína) con 1.2 g de β -dodecil maltósido en un vaso de precipitados con agitación suave durante 1 hora. Después, la muestra se centrifugó a 30,000 $\times g$ durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman L60 rotor 60 Ti. El sobrenadante se diluyó 1:3 con amortiguador A (Tris 50 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, glicerol 10%, β -dodecil maltósido 0,01%, ácido aminocaproico 50 mM; pH 8.4) y se cargó en una columna Source 15/Q (8 mL), conectada a un ÄKTA monitor UPC-900 Workstation (GE Healthcare Life Sciences) con un flujo de 1.0 mL/min. Luego de un lavado de 3 volúmenes de columna para obtener una línea base en la señal de absorbancia a 280 nm, las proteínas fueron eluidas mediante un gradiente de NaCl 0 a 500 mM (20 volúmenes de columna) en el mismo amortiguador. Se obtuvieron fracciones de 2 mL, una muestra de estas fracciones se cargó en un gel del 4-12% para electroforesis azul nativa. Se realizó la zimografía de complejo I para identificar las fracciones enriquecidas, descrita en el punto 5.

Separación por cromatografía de exclusión molecular: Las fracciones enriquecidas con actividad de complejo I se concentraron a 5000 rpm en intervalos de 10 minutos en un filtro para centrifuga Amicon Ultra-15 con un corte de 100 kDa (Millipore) hasta un volumen final de 600 μL . La muestra se inyectó en una columna Superose 6 Increase 10/300 (24 mL) equilibrada con amortiguador C (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mM, glicerol 10%, β -dodecil maltósido 0.01%, ácido aminocaproico 50 mM; pH 8.4) conectada a un ÄKTA monitor UPC-900 Workstation (GE Healthcare Life Sciences) con un flujo de 0.25 mL/min. Se recolectaron fracciones de 0.5 mL que se visualizaron en un gel de electroforesis azul nativa.

7. Resolución de subunidades mediante geles 3D-BN/SDS-glicina/SDS-tricina

La muestra purificada fue separada en un gel azul nativo para eliminar alguna posible contaminación por alguna otra proteína presente en las fracciones recolectadas. Posteriormente, la banda correspondiente al complejo I se cortó del gel y se separó en un gel de glicina (concentración 12% de acrilamida), a temperatura ambiente. La banda de segunda dimensión se colocó en el gel de SDS-tricina (concentración 14% de acrilamida) para obtener un patrón electroforético 3D de los péptidos que conforman el complejo respiratorio. Por último, se calculó el peso molecular

aproximado de cada punto por densitometría de las bandas y su migración relativa con el programa GelAnalyzer (Versión: 2010a freeware).

8. Análisis por espectrometría de masas (EM)

Se solubilizaron membranas totales con β -lauril maltósido y se cargaron en un gel claro nativo del 5-15% por duplicado. La mitad del gel fue teñida con azul de Coomassie y la otra mitad se utilizó para el zimograma de complejo I. Una vez que se identificaron la banda 1 y 2 de complejo I, se cortaron del gel y se analizaron por Cromatografía líquida/espectrometría de masas de alta resolución de tiempo de vuelo análisis cuantitativo (LC-ESI-Q-TOF-MS). Las secuencias obtenidas de EM se sometieron a una identificación general y búsqueda de similitud de proteínas (*Domain Enhanced Lookup Time Accelerated*, DELTA-BLAST) para la identificación de los péptidos. El punto isoelectrico teórico, peso molecular y número de residuos se determinaron con el algoritmo ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>), los cruces transmembranales con el servidor Phobius (<https://phobius.sbc.su.se>) y TMHMM v. 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), además de la búsqueda de dominios conservados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

VI. Resultados

Para lograr el objetivo planteado en el presente trabajo, primero se aseguró el crecimiento de *P. tricornutum* en las condiciones de laboratorio y la estandarización de un método de rompimiento y preparación de membranas totales para después continuar con la purificación del complejo I. De manera que la descripción de los resultados se dividió en 5 apartados principales: crecimiento, rompimiento, preparación de membranas totales, extracción de los complejos respiratorios y purificación y resolución polipeptídica del complejo I.

Crecimiento

El crecimiento de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* se realizó en un fotobiorreactor Antares I (Rodríguez-Bolaños *et al.*, 2023) (Figura 9) que permite modular la luz al cambiar el color incidente y la intensidad de la misma en los LEDs de espectro completo (Figura 9B,C) para el crecimiento de cultivos de hasta 8 litros. El primer reto fue obtener biomasa suficiente para los experimentos, para ello se probaron luces con diferente longitud de onda, pero manteniendo una intensidad de $100 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Primero, se utilizó luz blanca (400-700 nm) ya que abarca las longitudes de onda correspondientes a la parte visible del espectro electromagnético (Figura 10B). Al realizar una curva de crecimiento, se observó que la densidad máxima de células es de 5×10^6 células/mL a los 12 días. Este valor se usó como referencia y se comparó contra el crecimiento utilizando luz verde (515-525 nm) (Figura 10C). En este segundo caso, la cantidad de células aumentó al triple, es decir, 15×10^6 células/mL al doceavo día (Figura 10D). El tiempo de duplicación disminuye de 1.8 con luz blanca a 1.13 con luz verde.

Adicionalmente, se realizó cultivos con luz azul (455-465 nm) y luz roja (635-645 nm), pero el crecimiento fue similar a lo presentado con luz blanca. Cualitativamente no se observaron diferencias morfológicas en las células entre los diferentes tipos de luz (Figura 10E), pero fue posible apreciar un color café más intenso en aquellos cultivos crecidos con luz verde, reflejo de una mayor densidad celular (Figura 11).

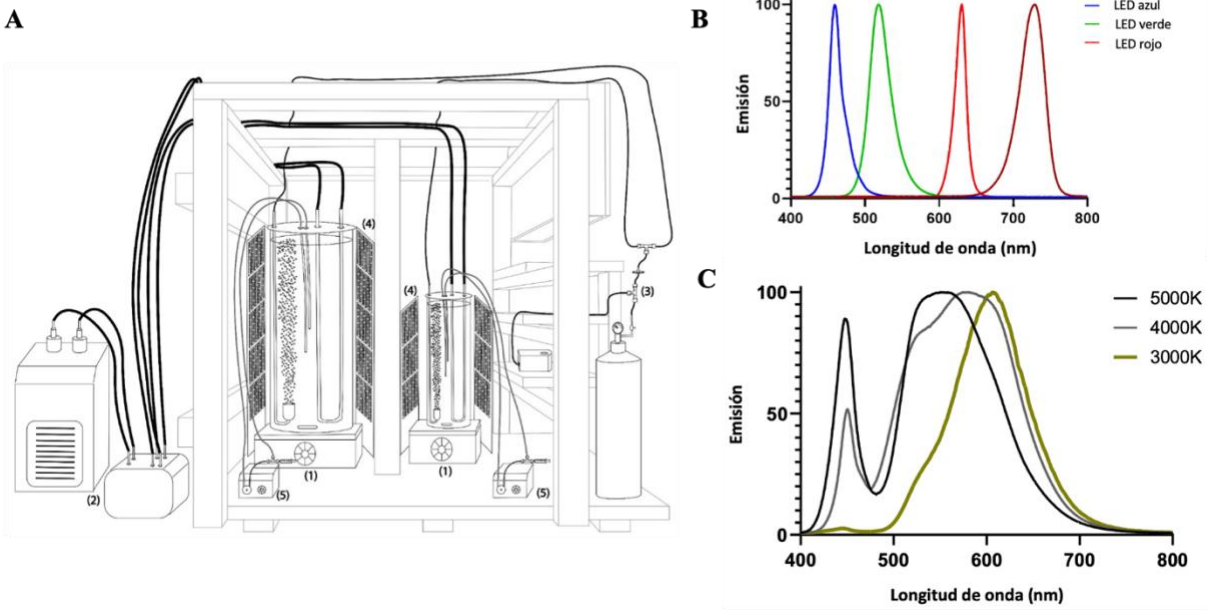


Figura 9. Esquema del fotobiorreactor Antares I. **A** Diagrama del equipo, dividido en 5 módulos: (1) vasos de cultivo, (2) control de temperatura, (3) inyección de gases, (4) sistema de luz y (5) sistema de muestreo. **B** Espectro de emisión de las diferentes luces del equipo. LED rojo lejano (720-730 nm), LED azul (455-465 nm), LED verde (515-525 nm) y LED rojo (635-645 nm). **C** Espectro de emisión de la luz blanca en diferentes temperaturas (K).

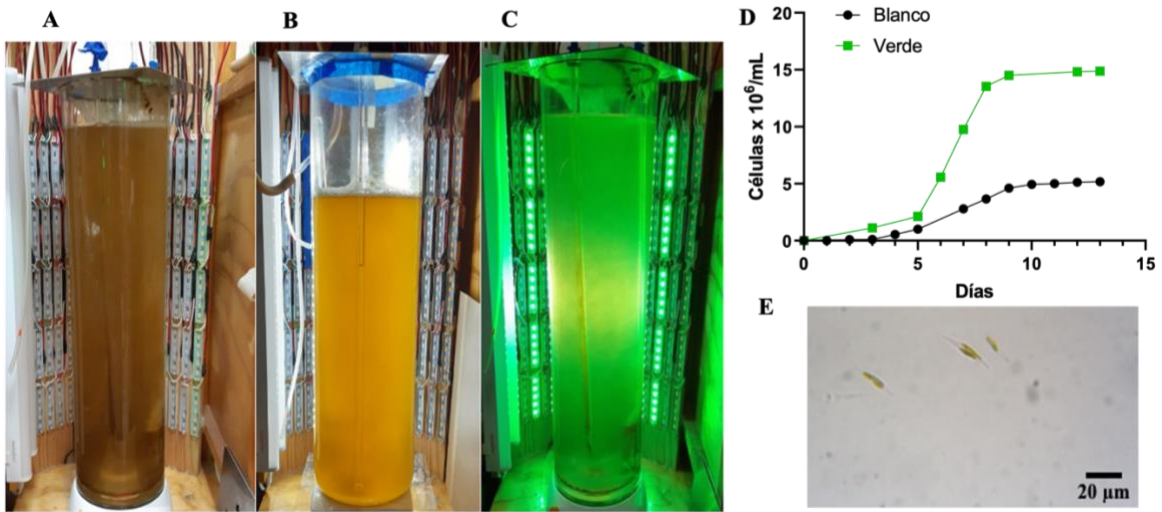


Figura 10. Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* en el fotobiorreactor Antares I. **A** Fotografía del cultivo en luz blanca (**B**) tomada sin luz para apreciar la coloración del cultivo. **B** Cultivo en crecimiento con luz blanca. **C** Cultivo en crecimiento con luz verde. **D** Curva de crecimiento con luz verde y luz blanca hasta los 13 días de crecimiento. **E** Micrografía a 100x de *P. tricornutum* crecida en el fotobiorreactor Antares I.

Para evaluar los posibles cambios en la maquinaria fotosintética se realizó la cuantificación de clorofila *a* y *c*₁+*c*₂, además de carotenoides totales. La absorbancia fue medida a partir de un extracto total de pigmentos con metanol (Figura 12A), donde se observó un incremento en la absorbancia en la región de 550-650 nm con un pico evidente en los 630 nm en el crecimiento con luz verde (Figura 12B). La cantidad de clorofila *a* con luz verde fue de 0.626 µg/mL mientras que con luz blanca fue de 0.452 µg/mL. Para clorofila *c* los valores fueron 0.425 µg/mL y 0.242 µg/mL, respectivamente. La relación de las clorofilas *c/a* para luz verde fue mayor que con luz blanca (0.68 y 0.53, respectivamente). La determinación de la concentración de carotenos totales fue de 2.34 µg/mL para luz verde y 0.737 µg/mL para luz blanca. Estos datos se resumen en la tabla 2.

Paralelo al cambio de luz en los cultivos, también se modificó el medio mínimo en el que creció *P. tricornutum*. Se añadió glicerol o acetato como fuente de carbono para aprovechar el crecimiento mixotrófico. En esta condición y con luz verde o blanca, el cultivo se desarrolló con normalidad, pero se observó un aumento de gotas lipídicas dentro de las células, lo cual dificultó la cosecha de las mismas al momento de centrifugar. También se utilizó el medio F/2 y ESAW con una formulación carente de sílice para facilitar el rompimiento celular.

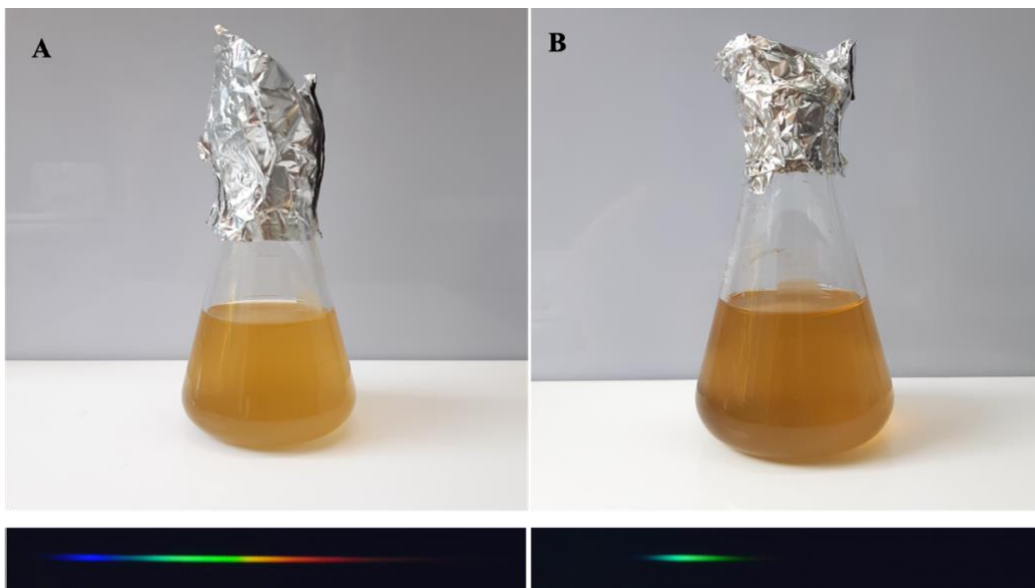


Figura 11. Imagen del cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* expuesto a diferente luz. **A** Cultivo con luz blanca. **B** Cultivo con luz verde. En la parte inferior de la imagen se observa el espectro de emisión del LED correspondiente capturado con un colimador de lente plano-convexo acoplado a un espectrómetro SMA-E (*Thunder Optics*, Francia), utilizando el software de adquisición Spectragryph.

Rompimiento

La célula de *P. tricornutum* está delimitada por una frústula protectora. El segundo reto para lograr el objetivo planteado fue encontrar la forma de romper dicha frústula sin comprometer los organelos. Es por ello que se probaron distintos métodos, manteniendo siempre la muestra a 4°C.

Primero, se intentó la molienda de las células con mortero (Figura 13). Para facilitar la ruptura, se adicionó arena o hielo seco a la muestra y se realizó la molienda durante 20-30 minutos de manera constante. Sin embargo, al observar al microscopio muchas de las células quedaron completas y no hubo un cambio notorio al aumentar el tiempo de molienda o las repeticiones. Pese a que, fue el método más suave para obtener las membranas, se descartó debido al cambio en la reproducibilidad del mismo. El segundo intento fue con prensa de French, se aplicaron 10 MPa, pero las células salieron casi intactas y al hacer un segundo ciclo aumentó la temperatura de la prensa. También, se probó congelar y descongelar la muestra en un baño de hielo seco con acetona y agua a 4°C, pero después de varios ciclos de congelamiento las células no sufrieron daño evidente.

Como tercera opción se probaron perlas de vidrio (Figura 14) con dos diferentes tamaños de diámetro: 500 y 106 μm . El rompimiento fue de manera mecánica con un mezclador de vórtice y el principal factor que cambió el resultado fue la dilución del botón de células con amortiguador. Se realizaron diluciones 1:2, 1:4 y 1:5, encontrando esta última la más adecuada sin aumentar demasiado el volumen final a romper. Con las perlas de 106 μm no se rompieron las células, ya que al momento de colocar en el mezclador no se movían homogéneamente dentro del tubo, así que se continuó con las perlas de 500 μm . También se cambiaron los tiempos de agitación. Se probó cinco ciclos de 3 minutos, tres ciclos de 5 minutos y dos ciclos de 8 minutos, con descanso mínimo de 3 minutos en hielo. El mejor resultado se obtuvo con tres ciclos de 5 minutos y para disminuir la cantidad de células completas se centrifugó la muestra para dar un segundo o tercer tratamiento de rompimiento.

Por último, se aplicó ultrasonido con un sonicador BRANSON 250 SONIFIER (Figura 15). Para determinar la condición con la que mejor se rompieron las células se probó cambiar el tiempo y

potencia para procesar la muestra. Se utilizó siempre una amplitud al 50% con pulsos de encendido de 1 segundo. En cuanto a la potencia se utilizaron valores de 30, 60, 90 y 120 watts, con ciclos de 15 s, 30 s, 1 min y 2 min. También se intercambi6 el tama1o de la extensi6n de salida entre 3 y 12 mm de diámetro. De las diferentes combinaciones que se probaron, la que mostr6 un mejor resultado, es decir, mayor rompimiento de las c6lulas y la integridad de las membranas, fue aplicar 1 minuto total de rompimiento a una intensidad de 90 watts en 2 ciclos de 30 segundos, dejando entre cada ciclo 30 segundos de descanso en hielo. En el caso de los 2 minutos totales, la muestra se calent6 a1n con enfriamiento y se observ6 un cambi6 de coloraci6n de caf6 a verde. Por el contrario, si se aplicaba un tiempo menor a un minuto, incluso con potencia de 120 watts, el n1mero de c6lulas completas era mayoritario.

En cada m6todo y condici6n probada, se evalu6 la integridad de la muestra con la solubilizaci6n de las membranas totales y posterior resoluci6n en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Bajo esta observaci6n, los tres mejores m6todos y donde siempre se detect6 la presencia de complejo I en gel fue con mortero, perlas de vidrio y sonicador (Figura 16). Dado la reducci6n de tiempo, reproducibilidad y aumento de la muestra a procesar, se decidi6 usar ultrasonido en los apartados siguientes.

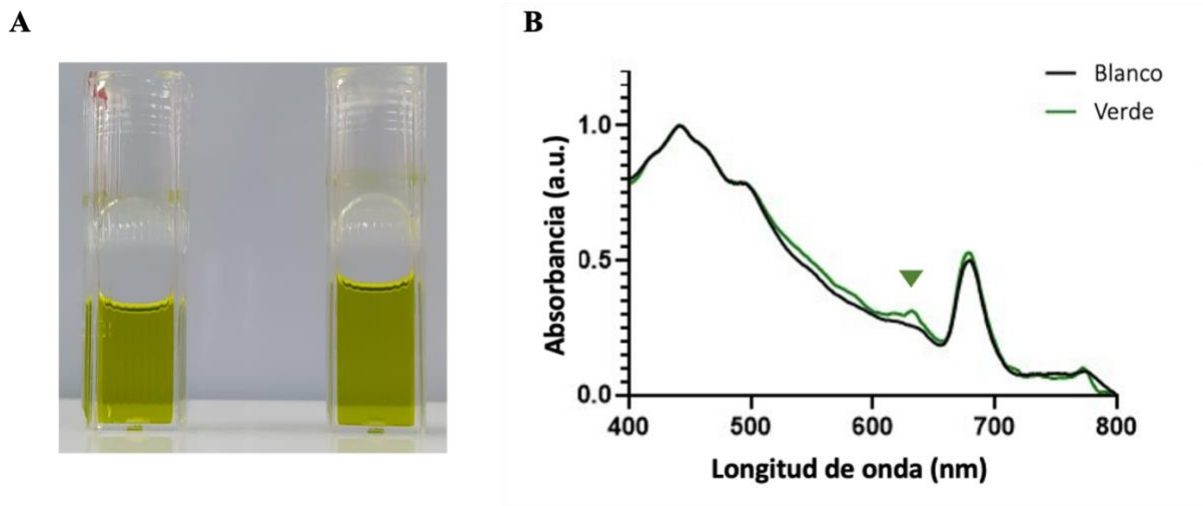


Figura 12. Efecto de la luz en la producci6n de pigmentos en *Phaeodactylum tricornutum*. **A** Extracto de los pigmentos con metanol absoluto. **B** Espectros de absorbancia de c6lula completa de *P. tricornutum* cultivada con dos diferentes luces: luz blanca y luz verde (515-525 nm). La flecha indica el cambio de absorbancia de los pigmentos con luz verde en la regi6n de 630 nm.

Tabla 2. Clorofila y carotenoides de *Phaeodactylum tricornutum* con diferente luz.

Pigmentos $\mu\text{g/mL}$				
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>c</i>	c/a	Carotenoides
Luz verde	0.626	0.425	0.68	2.394
Desviación estándar	0.175	0.459		0.724
Luz blanca	0.452	0.242	0.53	0.737
Desviación estándar	0.077	0.47		0.258

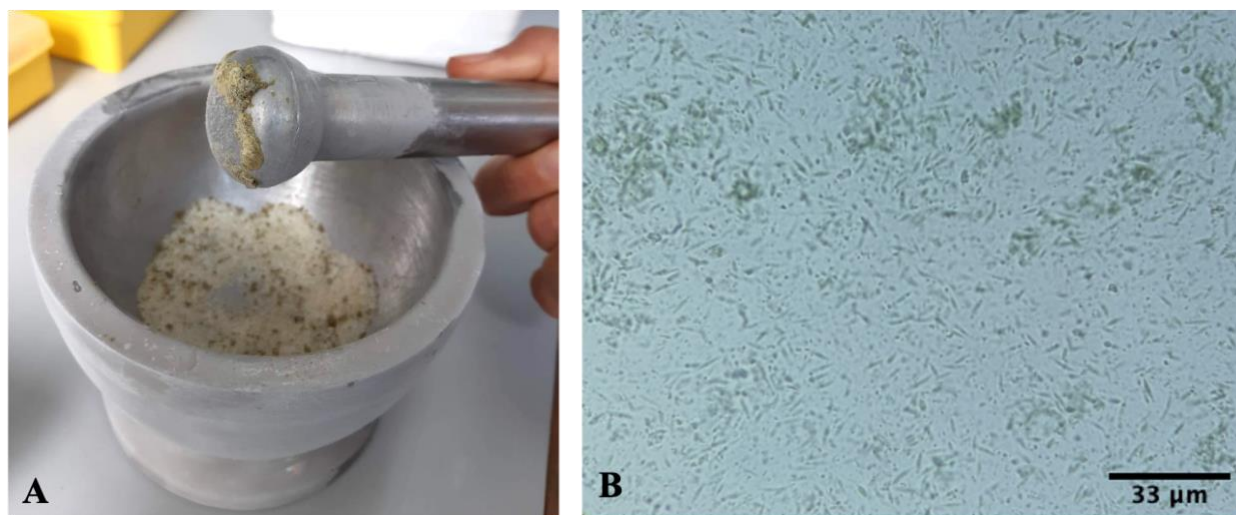


Figura 13. Rompimiento de *Phaeodactylum tricornutum* con mortero. **A** Imagen de la molienda manual de las células. **B** Micrografía a 400x después de romper.

Preparación de membranas totales

En este apartado se utilizó un amortiguador de sacarosa y otro con sorbitol en concentraciones de 0.25, 0.4 y 0.6 molar. Se varió el tiempo y velocidad de centrifugación con cada una de las concentraciones, sin embargo, con 0.4 y 0.6 molar las membranas no bajaron por completo, además de que quedaban algunas células completas en el botón resultante de membranas, por lo cual se eligió el amortiguador de sacarosa 0.25 molar para las siguientes preparaciones. No se encontró diferencia entre el uso de sacarosa o sorbitol en las bandas obtenidas en los geles de

acrilamida, no obstante, con el amortiguador de sorbitol las membranas requirieron un paso extra de lavado, ya que el sorbitol afectó el corrimiento de las proteínas en el gel después de ser solubilizadas. En cuanto a la cantidad de proteína, todas las preparaciones tenían en promedio 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

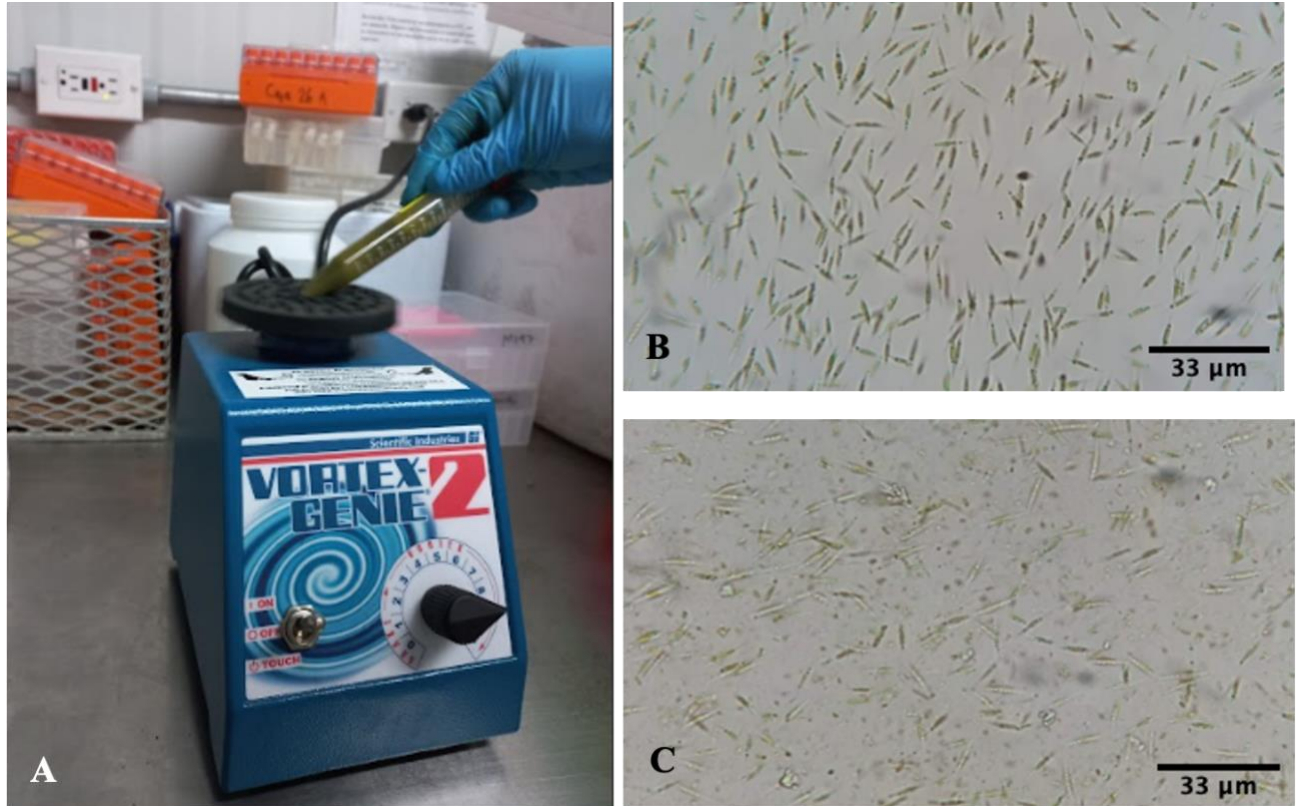


Figura 14. Rompimiento de *Phaeodactylum tricorneratum* con perlas de vidrio (500 μm). **A** Imagen de la molienda con perlas en mezclador de vórtice. **B** Micrografía de las células completas de *P. tricorneratum* antes de romper. **C** Micrografía después de romper (400x).

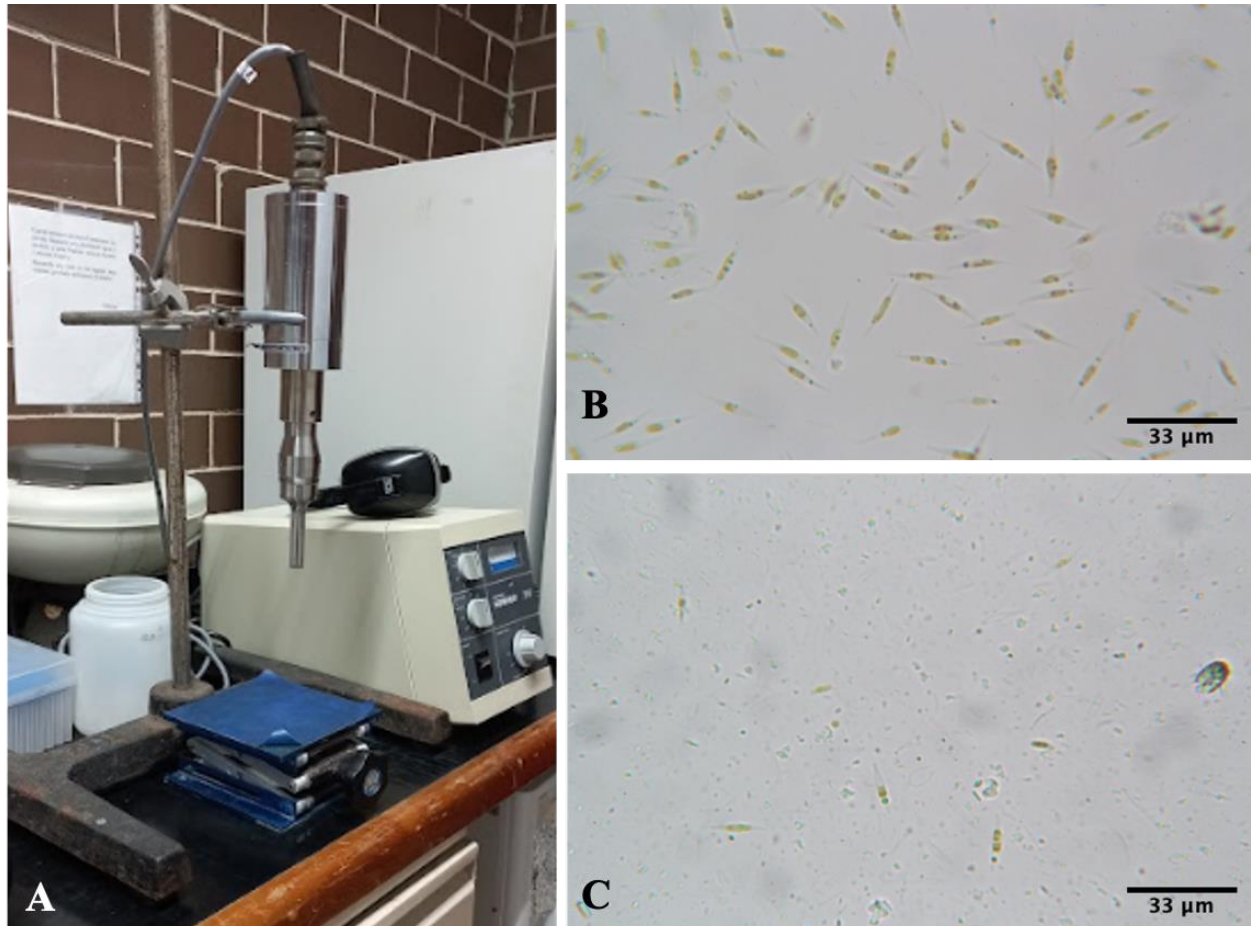


Figura 15. Rompimiento de *Phaeodactylum tricornutum* con ultrasonido. **A** Imagen del sonicador BRANSON 250 SONIFIER. **B** Micrografía de las células completas de *P. tricornutum* antes de romper. **C** Micrografía después de romper (400x).

Posterior a la elección de amortiguador, se procedió a extraer las membranas de los cultivos autotrófico (control) y mixotrófico (glicerol y urea). En el caso de las membranas que crecieron sin fuente de carbono se observó un patrón electroforético con dos bandas que presentan actividad de NADH:NBT oxidorreductasa y por debajo de estas, las bandas verdes correspondientes a los fotosistemas. Por el contrario, cuando se utilizó glicerol o urea, en ambas condiciones la presencia de complejo I se mantuvo, pero las bandas de los fotosistemas fueron menos evidentes y su presencia fue casi nula en el gel (Figura 17A). Se comparó el volumen bruto de la banda de complejo I por densitometría. En el carril sin glicerol, las bandas de complejo I representan el 25% cada una, mientras que con glicerol y urea alrededor del 32%, lo que sería un 7% más debido a la

casi nula presencia de las bandas verdes. También se observó un cambio de coloración en los cultivos que crecieron con fuente de carbono (Figura 17B). Con glicerol, las diatomeas adquirieron una coloración amarilla, es decir, perdieron su color café oscuro que se observa en condiciones fotoautótrofas con luz verde.

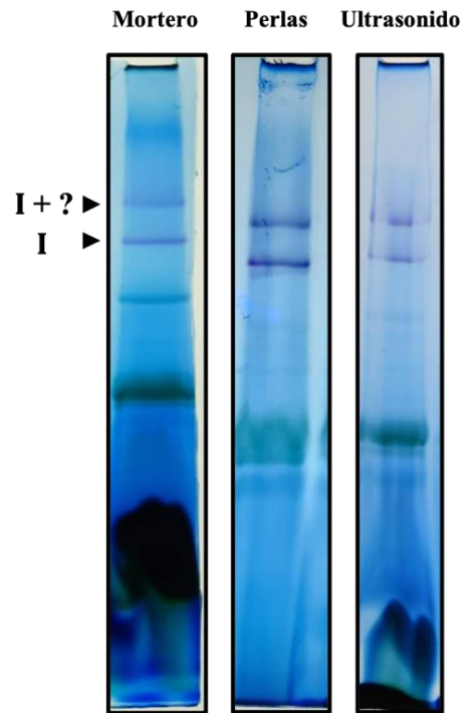


Figura 16. Comparación de las membranas totales de *Phaeodactylum tricornutum* extraídas con tres métodos de rompimiento diferentes. Solubilizadas con lauril maltósido- β al 2% y separadas mediante electroforesis azul nativa en un gel de poliacrilamida, con tinción de actividad de complejo I con NADH y NBT. **A** Mortero. **B** Perlas de vidrio (500 μ m). **C** Ultrasonido (90 W).

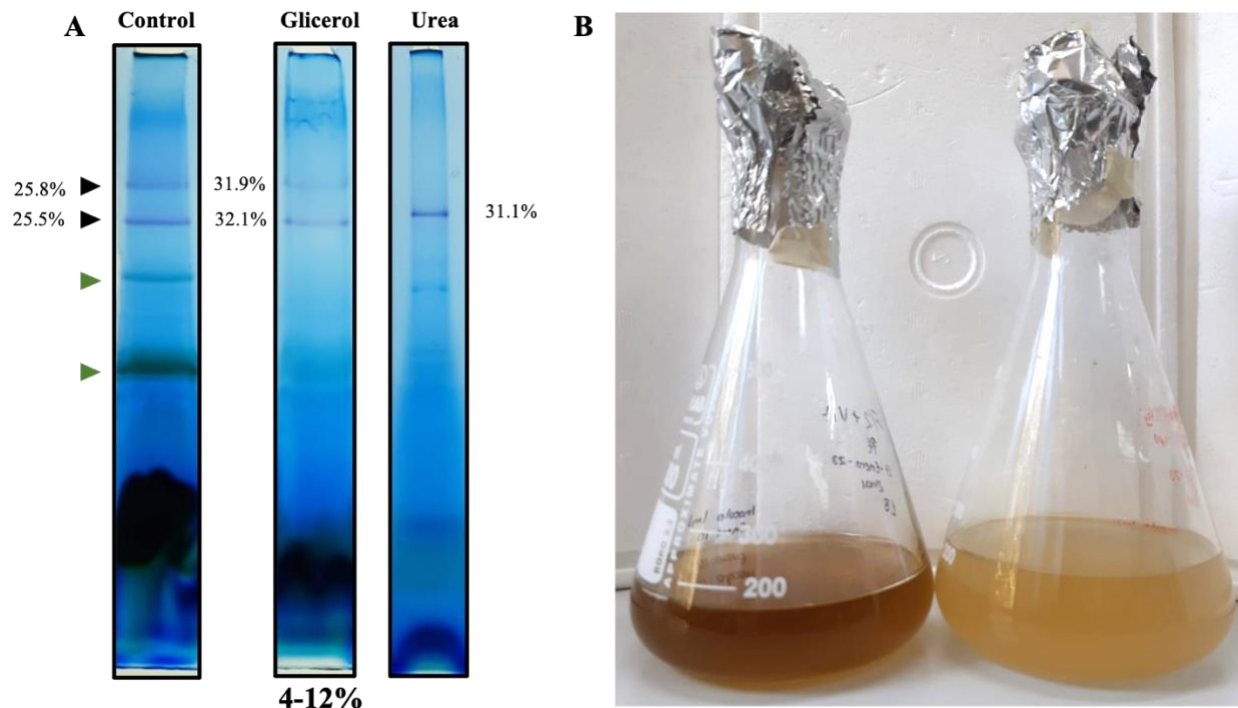


Figura 17. Crecimiento mixotrófico de *Phaeodactylum tricoratum*. Membranas totales de un cultivo sin fuente de carbono, uno con glicerol y otro con urea fueron solubilizadas con lauril maltósido beta al 2%. **A** Las fracciones solubles se resolvieron en un gel de poliacrilamida para electroforesis azul nativa y se realizó la tinción de actividad de complejo I con NADH y NBT. Los porcentajes muestran la proporción de CI con respecto a las otras proteínas que aparecen en los carriles. **B** Imagen del cultivo de *P. tricoratum* sin fuente de carbono y de manera mixotrófica (glicerol) bajo luz verde (515-135 nm).

Extracción de los complejos respiratorios

Para la extracción de las proteínas de la fosforilación oxidativa, específicamente el complejo I, se utilizaron diferentes detergentes en la solubilización de las membranas (Figura 18A). Con el detergente β -dodecil maltósido al 2% se observaron dos bandas con actividad de complejo I, una de mayor peso molecular que la otra (banda 1 y banda 2), así que se usó como referencia para la extracción con otros detergentes. Se solubilizó una misma muestra de membranas con digitonina y glicodiosgenina (GDN101) al 4%, tween-20, tritón x-100, α -dodecil maltósido y β -dodecil maltósido al 2%. Se encontró que con alfa dodecil maltósido y digitonina se observaron ambas bandas mejor definidas en el gel. Al ser detergentes suaves usados en la extracción de

supercomplejos, la banda 1 podría ser la asociación de complejo I con otro componente de la cadena respiratoria.

En el caso de tween-20 y tritón x-100 al 2% no fue posible observar bandas en el gel con esta concentración de detergente, así que se aumentó la concentración al 4%, pero sólo se obtuvo la banda 2 (de menor peso) y la misma cantidad de bandas entre ambos. Con GDN al 4%, la extracción de la banda 1 de CI fue menor que con digitonina, sin embargo, la solubilización con GDN permitió la extracción de más proteínas y se observó la aparición de nuevas bandas en el patrón electroforético, e incluso una nueva banda con actividad de complejo I.

Se realizó otro gel donde se comparó la solubilización con beta dodecil maltósido al 2% y GDN al 4% (Figura 18B). Con actividad de complejo I, se identificaron las dos bandas características y una nueva con actividad de mayor peso molecular en el caso de GDN, pero en menor proporción. Para observar un cambio cuantitativo en la cantidad de proteína que se extrae con ambos detergentes, se procedió a la determinación de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad) de las membranas antes y después de solubilizar. Se encontró que con GDN se obtiene entre 2 y 3 μg más de proteína por μL en el solubilizado.

Para la realización de los zimogramas se utilizó β -dodecil maltósido al 2% (Figura 19) y electroforesis clara nativa. En el caso del complejo I fue estable la aparición de la doble banda. También se realizó la actividad de complejo III y complejo IV, pero no fue posible identificarlos por esta vía ya que no se tiñó alguna banda que indicara su presencia. La actividad de hidrólisis del complejo V se hizo evidente en tres zonas a lo largo del gel, pero la única banda bien definida se observó debajo de las dos del complejo I que migra en el gel a la altura de las bandas verdes. De este gel en particular, se cortaron las dos bandas de complejo I para el análisis de espectrometría de masas.

Como se mencionó anteriormente, en *P. tricornutum* se observó una doble banda con actividad de NADH deshidrogenasa y el cambio en los detergentes indicó una posible asociación entre complejos, por lo que se procedió a calcular el peso molecular aproximado de la banda 1 y banda 2, además de la banda con actividad de hidrólisis de ATP, tomando como referencia los complejos

de las algas *Polytomella parva* y *Euglena gracilis* (Figura 20). En el gel se observó que la banda 1 de CI de *P. tricornutum* queda por encima del complejo I de *P. parva* (1.0 MDa) y por debajo del complejo I de *E. gracilis* (1.4 MDa), mientras que la banda 2 queda por debajo de los dos CI de referencia. La regresión lineal donde se incluye también los complejos III, IV y V de *P. parva* y *E. gracilis* (Figura 20D), mostró que la banda 1 de CI de *P. tricornutum* tiene un peso aproximado de 1.1 MDa y la banda CI 2 pesa 780 kDa, por lo que sólo difieren entre ellas por un peso aproximado de 320 kDa.

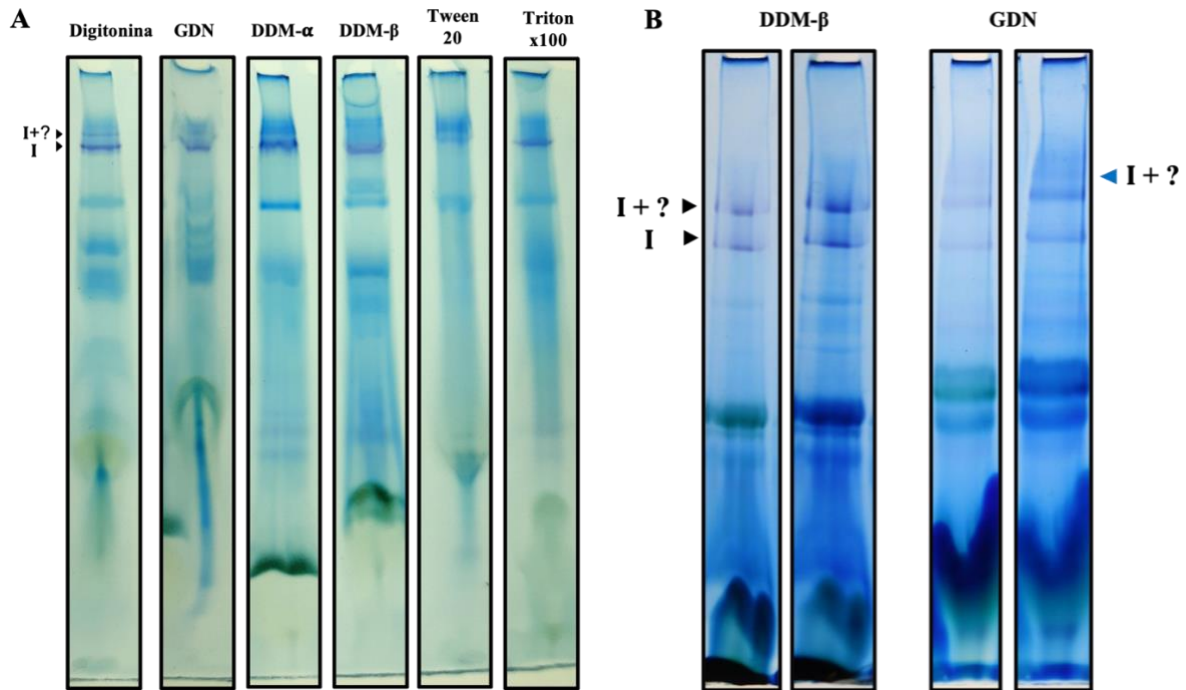


Figura 18. Extracción de las proteínas de *Phaeodactylum tricornutum* con diferentes detergentes. **A** Membranas solubilizadas con digitonina, GDN, Tritón x-100 y Tween-20 al 4%; α -dodecil maltósido y β -dodecil maltósido al 2%. Las proteínas extraídas se cargaron en un gel de poliacrilamida del 5-15% para electroforesis clara nativa. En gel tinción con azul de Coomassie y actividad de complejo I con NADH y NBT. **B** Extracción de supercomplejos. Membranas solubilizadas con beta dodecil maltósido al 2% lado izquierdo y GDN al 4% lado derecho. Gel de poliacrilamida de 4-12% para electroforesis azul nativa, con tinción de actividad de complejo I y con azul de Coomassie.

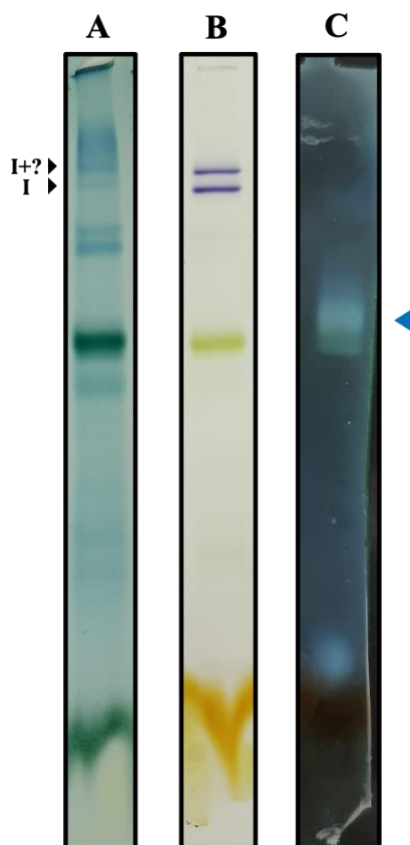


Figura 19. Zimograma de los complejos mitocondriales de *Phaeodactylum tricornutum*. Las membranas solubilizadas con β -dodecil maltósido al 2% se cargaron en un gel de poliacrilamida del 5-15%, electroforesis clara nativa. **A** Tinción con azul de Coomassie. **B** Actividad de complejo I con NADH y nitroazul de tetrazolio (NBT). **C** Actividad de hidrólisis de ATP sintasa, incubado con ATP 8 mM, MgSO_4 14 mM y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.2%; pH 8.4

Purificación del complejo I

Una vez identificado el complejo I y determinado su peso se procedió con su purificación mediante cromatografía líquida con un sistema de dos pasos en FPLC. La muestra solubilizada y centrifugada se cargó primero en una columna de intercambio aniónico (Figura 21A). En el cromatograma se observaron tres picos de absorbancia, el primero más prominente que los otros dos. De las diferentes fracciones que se cargaron en un gel azul nativo para buscar la actividad de CI, sólo en 4 de ellas se encontró el complejo, que corresponden con la pendiente del primer pico de absorbancia y donde se encontraron también las bandas verdes de los fotosistemas.

En el paso por esta primera columna sólo apareció la banda de CI 2 y para separar el CI de los fotosistemas, se juntaron las fracciones correspondientes y se cargaron en una columna de exclusión molecular (Figura 21B). En el segundo cromatograma sólo se obtuvo un pico de absorbancia con un ligero cambio al inicio del pico antes de llegar al punto máximo. En el gel se corroboró que el cambio en esa señal corresponde al CI y en las fracciones siguientes aparecen los fotosistemas. Nuevamente, la actividad de CI con NADH y NBT mostró únicamente la banda 2, pero en dos fracciones se obtuvo el complejo I mitocondrial enriquecido.

Composición polipeptídica del Complejo I de *P. tricornutum*

Con el complejo I ya purificado, el siguiente paso en el análisis fue realizar un sistema de geles 1D-BN/2D-glicina-SDS/3D-tricina-SDS para obtener el número de péptidos que lo conforman (Figura 22). En el gel 2D-glicina se observaron 9 bandas, que después en el gel 3D-tricina se separaron en 27 puntos, que van desde los 11 hasta los 99 kDa (Figura 23). El peso molecular de cada punto/péptido fue determinado por densitometría tomando como referencia un estándar de peso molecular, tanto para el gel 2D-glicina-SDS como para el gel 3D-tricina-SDS. Los valores de peso molecular determinado fueron muy similares entre ambos sistemas como se puede observar en la Tabla 3.

Así mismo se compararon con los pesos de los péptidos que se identificaron mediante espectrometría de masas, donde se obtuvieron un total de 20 subunidades correspondientes al complejo I (Tabla 4), tanto del sector membranal como del brazo matricial. De estos 20 péptidos, 19 de ellos corresponden con algún peso molecular determinado a partir de los geles, por lo que el peso molecular que coincide se colocó a un lado del número del péptido en la Figura 22, quedando de la siguiente manera primero el número de péptido con el peso de espectrometría de masas en paréntesis: 8 (54.1 kDa), 9 (45.1 kDa), 11 (31.2 kDa), 12 (29.2 y 29.6 kDa), 14 (26.3 kDa), 15 (24.6 y 24.4 kDa), 16 (21.9), 17 (19.0 kDa), 26 (18.2 kDa), 18 (17.6 kDa y 18.2), 19 (15.3 y 15.0 kDa), 22 (11.6 y 11.1 kDa), 23 (9.8 kDa), 24 (8.4).

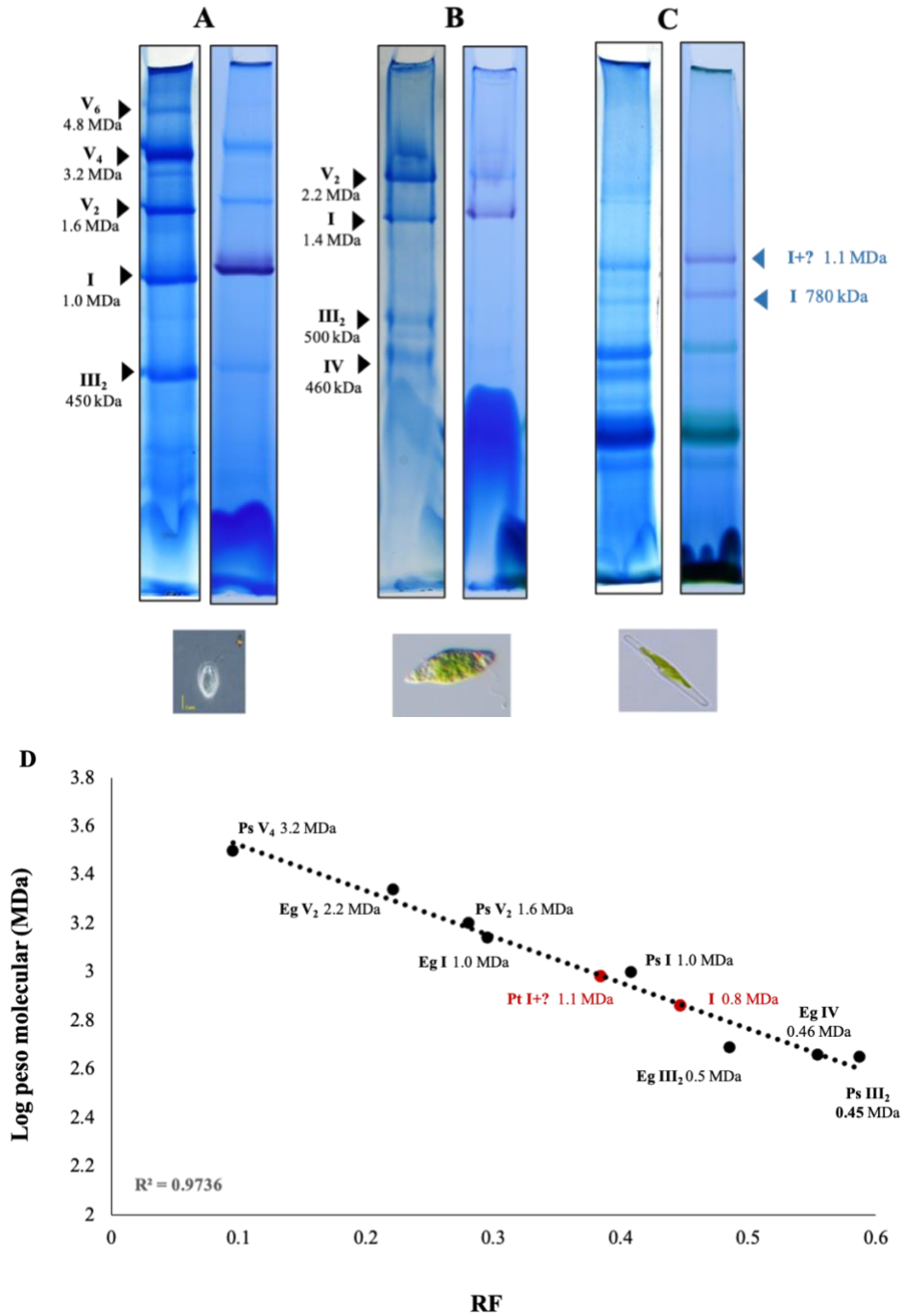


Figura 20. Masa molecular estimada para la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de *Phaeodactylum tricornutum*. Comparación de la migración en un gel de poliacrilamida 4-12% de los complejos mitocondriales de **A** *Polytomella parva*, **B** *Euglena gracilis* y **C** *P. tricornutum*. Se realizó la tinción con azul de Coomassie y actividad de complejo I. **D** Los logaritmos base 10 de las masas moleculares de *E. gracilis* y *P. parva* se representaron contra su distancia de migración en el gel y se interpoló el CI de *P. tricornutum* para inferir la masa molecular de la banda 1 y 2.

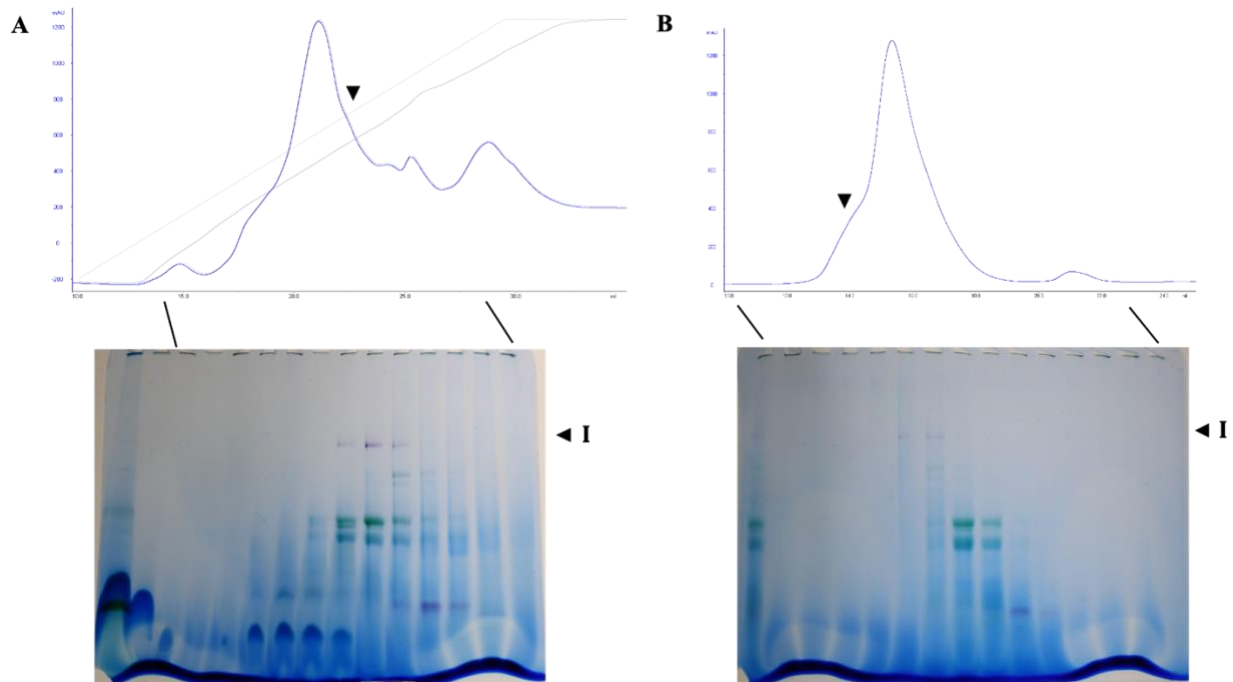


Figura 21. Purificación del complejo I mitocondrial de *Phaeodactylum tricornutum* mediante cromatografía líquida (FPLC). Se solubilizaron membranas totales (160 mg de proteína) con 1.2 g β -dodecil maltósido y se pasaron por dos columnas. **A** Perfil de elución de la columna de intercambio aniónico: la línea azul representa la absorbancia a 280 nm, con tres picos principales. Debajo del cromatograma se muestra un gel azul nativo del 4-12% con las fracciones de la columna y actividad de NADH deshidrogenasa. **B** Perfil de elución de la columna de exclusión molecular: la línea azul representa la absorbancia a 280 nm, con dos picos. Debajo se muestran las fracciones en un gel azul nativo (4-12%) con la actividad del complejo I puro. El primer carril en ambos geles corresponde a las membranas solubilizadas antes de cargar en las columnas. En ambos cromatogramas la flecha señala al complejo I. Las bandas verdes corresponden a los fotosistemas.

Se observó también que con el gel de glicina se obtuvo una mejor resolución general, sin embargo, con el gel de tricina fue posible determinar de mejor manera el peso de aquellos péptidos por debajo de los 15 kDa debido a que se alejan de la diagonal en el corrimiento. También fue posible apreciar que con el análisis EM se identificaron mayormente péptidos pequeños (por debajo de los 60 kDa) y con el gel 3D se encontraron 12 más y de mayor peso.

Como se mencionó anteriormente, con el análisis EM se lograron identificar 20 secuencias de péptidos correspondientes al complejo I (banda 1 y 2), que sumado el peso de todos da un valor de 466.5 kDa. Se corroboraron con un análisis delta-BLAST, además de la búsqueda en diferentes algoritmos (ver métodos) para obtener el peso molecular, cruces transmembranales, número de residuos, punto isoeléctrico y dominios conservados. En la tabla 5 se muestra un resumen de los 20 péptidos, pero también se encontraron otras proteínas mitocondriales que no fue posible identificar o relacionar con las ya descritas en las bases de datos, por lo que podrían ser proteínas específicas del CI de *P. tricornutum*.

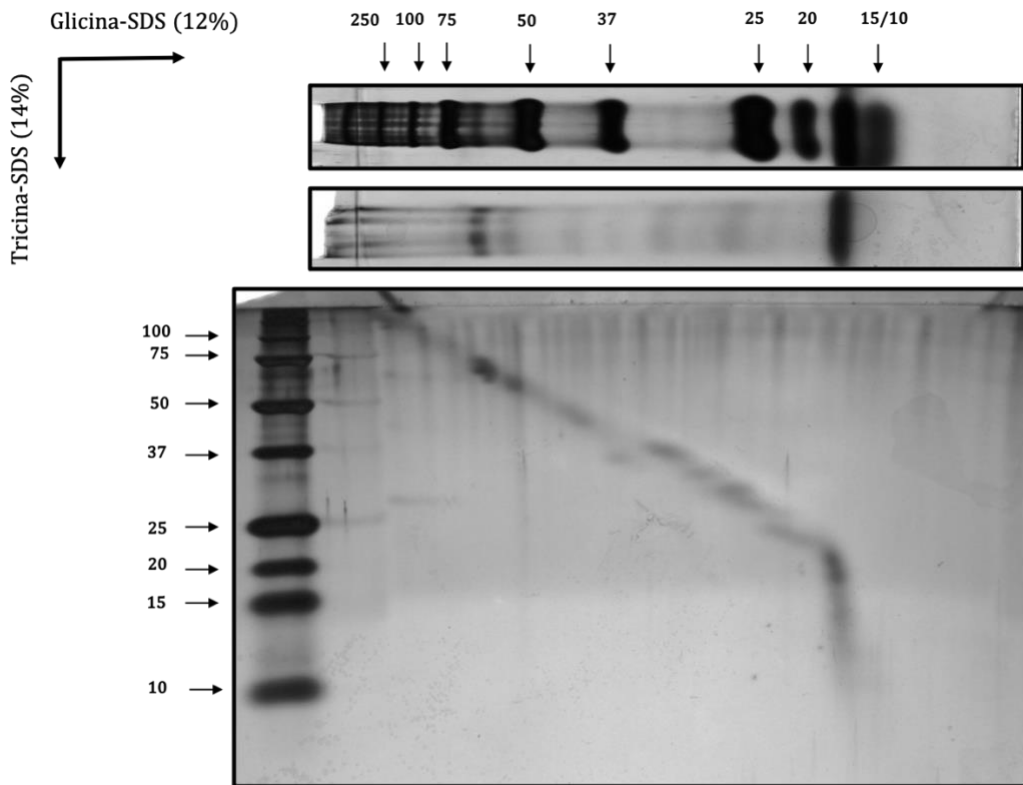


Figura 22. Resolución 3D de los péptidos que constituyen la NADH:ubiquinona oxidoreductasa de *Phaeodactylum tricornutum*. El complejo I purificado se resolvió primero en un gel azul nativo. La banda correspondiente se cortó y se cargó en un gel 2D-glicina-SDS (12% de acrilamida). Luego, el carril de CI del gel 2D-SDS se colocó en un gel 3D-tricina-SDS (14% acrilamida) y se realizó una tinción con plata.

Finalmente, se comparó la distribución de las subunidades identificadas para el complejo I de la diatomea entre distintos linajes tomando como referencia las estructuras determinadas de las siguientes especies: *Homo sapiens* (5XTD) (Guo *et al.*, 2017), *Bos taurus* (5LDW) (Zhu *et al.*, 2016), *Yarrowia lipolytica* (6YJ4) (Grba y Hirst, 2020), *Polytomella parva* (7ARD) (Klusch *et al.*, 2021) y *Tetrahymena thermophila* (8B6F) (Mühleip *et al.*, 2023) (Figura 24). Las tres primeras especies son de mamíferos y hongos pertenecientes a los Opisthokonta, grupo que no tiene las subunidades de anhidrasa carbónica, que sí aparecieron en *P. tricornutum* (Stramenopila), *P. parva* (Chloroplastida) y *T. thermophila* (Alveolata), siendo estas últimas dos especies las que tienen todas las subunidades encontradas en *P. tricornutum* y comparadas e iluminadas en las estructuras. Así mismo, es posible observar que los péptidos identificados de CI en *P. tricornutum* están distribuidos por toda la enzima, tanto asociadas con el sector membranal como en el sector periférico, lo que sugiere que la integridad del CI no se encuentra comprometida durante el procesamiento de aislamiento.

Tabla 3. Peso molecular determinado (kDa) de los péptidos resueltos con el gel 2D-glicina-SDS/3D-tricina-SDS del complejo I purificado de *P. tricornutum*.

Masa molecular determinada kDa		
No. péptido	Glicina	Tricina
1	99.59	92.61
2	88.41	81.17
3	86.16	74.47
4	84.25	74.47
5	80.54	64.94
6	75.03	65.93
7	73.13	59.88
8	64.50	56.63
9	56.53	48.39
10	53.01	41.56
11	46.46	37.74
12	43.71	28.27
13	37.33	33.08
14	34.34	28.55
15	29.9	23.67
16	26.37	22.38
17	24.57	19.32
18	22.67	17.02
19	22.1	16.43
20	19.81	12.94
21	18.28	11.75
22	17.25	11.23
23	16.43	9.74
24	15.61	8.20
25	14.92	6.97
26	14.68	6.08
27	14.59	5.24

Tabla 4. Peso molecular calculado (kDa) de los péptidos identificados por espectrometría de masas.

	Acceso	Número de residuos	Masa molecular calculada
1	Phatr3_J43944	493	54.1
2	Phatr3_J17671	397	45.1
3	Phatr3_EG02042	278	29.2
4	Phatr3_J48909	278	31.2
5	Phatr3_J41645	226	24.6
6	Phatr3_J48767	264	29.6
7	Phatr3_J11305	162	18.2
8	Phatr3_J49313	194	21.9
9	Phatr3_J24069	241	26.3
10	Phatr3_J14260	212	24.4
11	Phatr3_J22919	260	28.9
12	Phatr3_EG02174	184	19.0
13	Phatr3_J46858	159	17.6
14	Phatr3_J28620	136	15.3
15	Phatr3_J34392	244	28.2
16	Phatr3_J20948	104	11.6
17	Phatr3_EG00810	73	8.4
18	Phatr3_EG01582	86	9.8
19	Phatr3_EG00870	98	11.1
20	Phatr3_J35156	130	15.0

Tabla 5. Subunidades del Complejo I de *P. tricornutum* identificadas por espectrometría de masas.

No.	Proteína	Acceso	Número de residuos	Péptidos identificados	Abundancia (x10 ⁴)	Cobertura (%)	Masa molecular calculada (kDa)	TMH	Péptido señal	Dominio conservado
1	NDUFV1	Phatr3_J43944	493	8	1.54	25.15	54.1	0	1-13	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 1 ^a , subunidad NADH-quinona oxidoreductasa NuoF ^b
2	NDUFA9	Phatr3_J17671	397	9	1.61	31.5	45.1	0	1-15	NDUFA9 ^a , NDUFA9 ^b
3	gCA3	Phatr3_EG02042	278	10	3.81	57.6	29.2	0	—	Carbonato deshidrogenasa ^a , Similar a la anhidrasa carbónica gamm ^b
4	NuzM/ NDUFA7	Phatr3_J48909	278	9	1.64	53.96	31.2	0	—	NuzM ^{a,b}
5	NuoB	Phatr3_J41645	226	3	1.13	28.31	24.6	1	—	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad NuoB ^{a,b}
6	NDUFA4	Phatr3_J48767	264	5	1.89	28.4	29.6	0	—	NDUFA4 ^{a,b}
7	NDUFB9	Phatr3_J11305	162	5	0.66	42.0	18.2	0	—	Complejo 1_LYR_NDUFB9_LYRM3 ^{a,b}
8	NDUFA5	Phatr3_J49313	194	4	0.74	35.05	21.9	0	—	Super familia ETC_C1_NDUFA5 ^{a,b}
9	gCA	Phatr3_J24069	241	7	0.61	49.79	26.3	0	—	Proteína no caracterizada ^b , similar a la anhidrasa carbónica gamma ^a
10	NuoI	Phatr3_J14260	212	4	1.59	22.64	24.4	0	—	NADH-quinona oxidoreductasa NuoI, Subunidad NADH-quinona oxidoreductasa NuoI ^{a,b}
11	NuoE	Phatr3_J22919	260	2	0.62	8.46	28.9	0	—	Subunidad E de oxidoreductasa dependiente de NAD(P)H, ferredoxina similar a tioredoxina [2Fe-2S] ^{a,b}
12	Rieske-like	Phatr3_EG02174	184	3	1.15	24.45	19.0	0	1-15	Dominio tipo Rieske [2Fe-2S] ^{a,b}
13	21 kDa	Phatr3_J46858	159	2	1.2	22.01	17.6	1	1-18	NADH-ubiquinona oxidoreductasa complejo I, subunidad 21 kDa ^{a,b}
14	NDUFA13	Phatr3_J28620	136	2	0.84	22.79	15.3	1	—	Proteína GRIM-19 ^{a,b}
15	NDUFA12	Phatr3_J34392	244	3	1.6	25.4	28.2	0	—	Super familia NDUFA12 ^{a,b}
16	Cyt c	Phatr3_J20948	104	2	1.86	13.46	11.6	0	—	Proteína de la familia del citocromo c ^{a,b}
17	MWFE	Phatr3_EG00810	73	1	0.44	19.17	8.4	1	—	NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad MWFE ^{a,b}
18	NDUFA3	Phatr3_EG01582	86	1	2.54	23.25	9.8	2	—	— ^a , NADH:ubiquinona Oxidoreductasa, subunidad NDUFA3 ^b
19	NDUFB7	Phatr3_EG00870	98	1	0.24	7.1	11.1	0	—	NADH-ubiquinona oxidoreductasa B18 subunidad (NDUFB7) ^{a,b}
20	ESSS	Phatr3_J35156	130	1	0.17	5.4	15.0	1	—	ESSS subunidad de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa ^{a,b}

Búsqueda de secuencia con DELTA-BLAST (a) y base de datos de dominios conservados (b).

El máximo del valor e para filtrar los resultados en la búsqueda de dominios conservados fue 10⁻⁵

Número de cruces transmembranales (TMH)

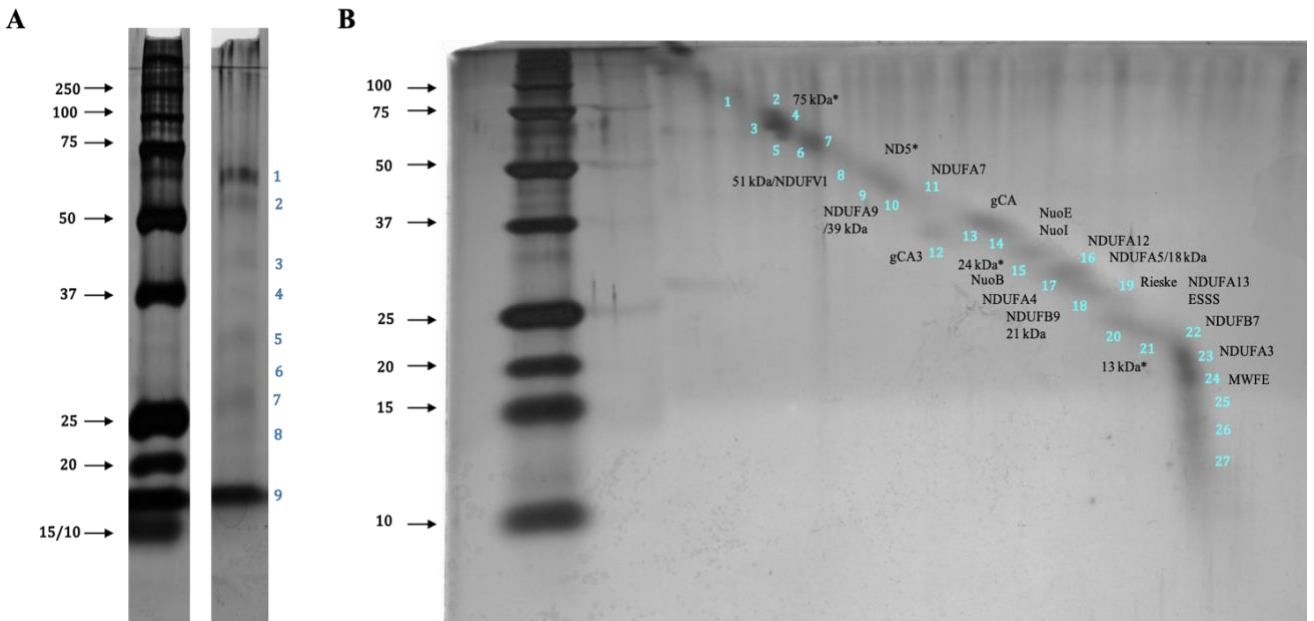


Figura 23. Resolución polipeptídica de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa de *Phaeodactylum tricornerutum* y posible distribución de los péptidos identificados por espectrometría de masas. **A** Péptidos resueltos en el gel 2D-glicina-SDS (12% de acrilamida). **B** Péptidos resueltos en el gel 3D-tricina-SDS (14% acrilamida). Las letras en negro indican las subunidades identificadas por espectrometría de masas. En color cian se enumeran los péptidos identificados en el gel. El asterisco señala los péptidos encontrados en el gel que corresponden con otra subunidad reportada en la literatura.

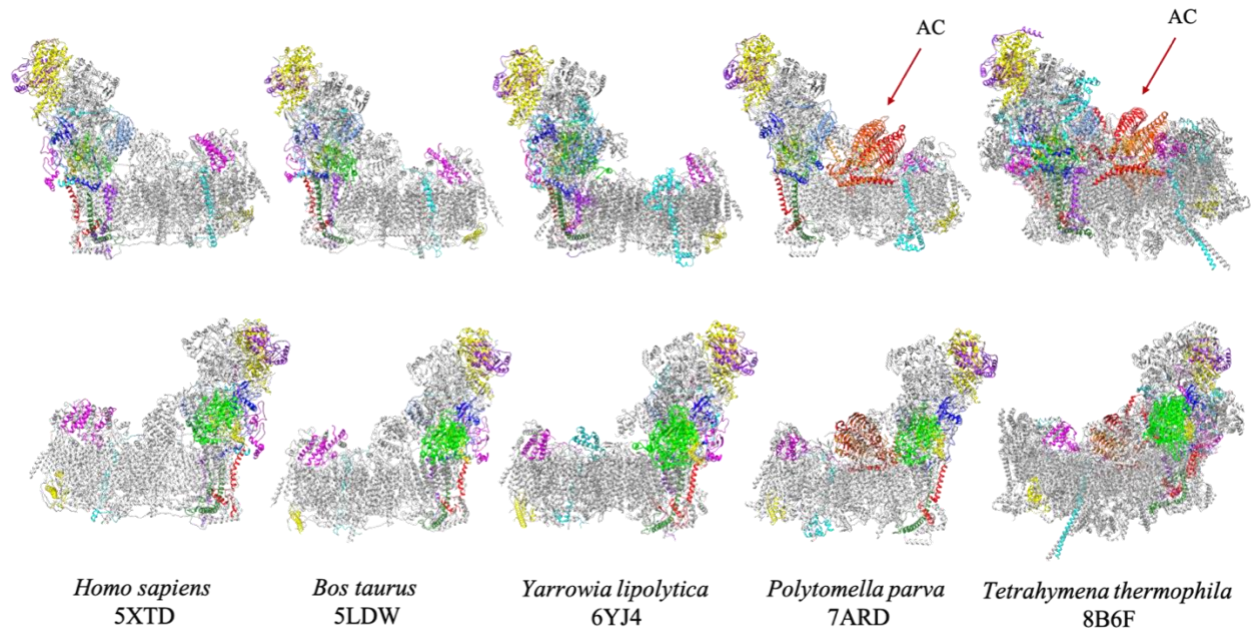


Figura 24. Identificación de las subunidades del complejo I de *Phaeodactylum tricornerutum* con respecto a otros linajes. Se colorearon las subunidades encontradas por espectrometría de masas en *P. tricornerutum* sobre las estructuras del complejo I de terminado para *Homo sapiens* (5XTD) (Guo *et al.*, 2017), *Bos taurus* (5LDW) (Zhu *et al.*, 2016), *Yarrowia lipolytica* (6YJ4) (Grba y Hirst, 2020), *Polytomella parva* (7ARD) (Klusck *et al.*, 2021) y *Tetrahymena thermophila* (8B6F) (Mühleip *et al.*, 2023). En colores rojos se muestra la anhidrasa carbónica ausente en el linaje Opisthokonta, pero presente en otros eucariontes como *P. parva*, *T. thermophila*, *E. gracilis* y ahora en *P. tricornerutum*.

VII. Discusión

Crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* en el fotobiorreactor Antares I

En este trabajo se mostró que la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* crece de manera adecuada en el fotobiorreactor Antares I lo que permitió controlar las condiciones de cultivo para garantizar la reproducibilidad de los resultados. En la curva de crecimiento se observó el comportamiento sigmoide característico, además de un incremento en la biomasa tres veces mayor con luz verde. En las microalgas, su crecimiento se ha visto afectado por diferencias en la fuente de luz como lámparas fluorescentes o LEDs (Bialevich *et al.*, 2022), así como por la longitud de onda aplicada y se ve reflejado en la producción de metabolitos como ácidos grasos y pigmentos (Duarte *et al.*, 2021).

La mejora en el crecimiento con luz verde se ha observado en cultivos con sílice (Zhao *et al.*, 2014), sin embargo, en este trabajo, se utilizó una formulación libre de sílice debido a que *P. tricornutum* puede crecer de manera adecuada sin este elemento (Lewin *et al.*, 1958). Los análisis espectroscópicos indicaron un incremento en la absorbancia con un pico extra en la región de 630 nm, que puede estar relacionado con la modificación de los pigmentos ya que la relación de clorofilas *c/a* incrementó de 0.54 a 0.68 entre luz blanca y luz verde. Se ha observado que la clorofila *c* tiene un pico de absorbancia específico en 626 nm (Kirk, 1994). Esto sugiere que el aumento en la velocidad en el crecimiento está relacionado con la modificación de los pigmentos y la característica de la luz verde de penetrar con mayor eficiencia en los cultivos ópticamente densos comparado con otras longitudes de onda (Ooms *et al.*, 2017), más que con un cambio drástico en la maquinaria fotosintética.

El crecimiento con luz verde no es común en los organismos fotosintéticos debido a la absorbancia de sus pigmentos, predominantemente clorofila *a* que absorbe longitudes entre los 430-475 nm y 630-696 nm, pero en otras microalgas como *Picochlorum sp.* y *Chaetoceros sp.* se ha observado una eficiencia en su crecimiento similar con luz verde comparándola con luz roja y blanca (Paper *et al.*, 2022; Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002).

El incremento en la proliferación celular con luz verde puede estar relacionado también con la calidad de la luz y el aprovechamiento de la misma para su conversión de energía química a biomasa, ya que al existir una mayor eficiencia fotosintética la mayor parte de la energía no se pierde como fluorescencia o calor (Li y Liu, 2020). Otro punto a favor de la luz verde es que está en un nivel intermedio donde es bien absorbida a nivel de pigmento y nivel de célula, contrario a lo que sucede con la luz roja y azul. Para el alga *Isochrysis galbana*, por ejemplo, se ha demostrado una mejor eficiencia fotosintética y crecimiento con luz blanca más que con luz verde. Sin embargo, la luz blanca tricromática favoreció el crecimiento y un aumento en el contenido de pigmentos, pero disminuyó el valor de clorofila c/a (Li y Liu, 2020; Gorai *et al.*, 2014). Lo que concuerda en este trabajo ya que con luz blanca la relación de clorofila c/clorofila a fue menor con luz blanca que con luz verde para *P. tricornutum*.

Crecimiento mixotrófico

La dualidad de las diatomeas en su metabolismo para crecer de manera fotoautótrofa o mixotrófica les confiere ventajas como una mayor producción de lípidos, el rápido aumento de biomasa, así como la fijación simultánea de CO₂ y la oxidación de una fuente de carbono (Cerón-García *et al.*, 2000; 2006; Kitano *et al.*, 1997). En los experimentos se probaron distintas fuentes de carbono en combinación con una variación en la intensidad de luz para promover un aumento en la respiración tal como se ha descrito en trabajos anteriores (Grama *et al.*, 2016). La CTE es la tercera opción para satisfacer la demanda de lípidos y muestra un aumento cuando se ha saturado la fijación de glicerol debido al límite impuesto y la captación de fotones en el cloroplasto (Villanova *et al.*, 2021).

También se observó que una alta concentración de glicerol (arriba de 0.1 M) inhibe el crecimiento en los primeros días del cultivo y disminuye la concentración de clorofila y carotenos, que concuerda con lo reportado en otros estudios (Villanova *et al.*, 2021; Cerón-García *et al.*, 2005). Sin embargo, el glicerol es la fuente de carbono preferida por *P. tricornutum* debido a que no puede internalizar glucosa en su célula por la falta de glucosa permeasa (Zaslavskaja *et al.*, 2001). Para descartar que el cambio en el metabolismo fuera por algún otro nutriente se utilizó el medio ESAW (Berges *et al.*, 2001) porque tiene una composición estable y el crecimiento del alga no estaría limitado nada más que por la fuente de carbono que se añadió.

El complejo I de *Phaeodactylum tricornutum*

En este trabajo se logró purificar el complejo I mitocondrial de *Phaeodactylum tricornutum*. El peso molecular estimado fue de 780 kDa, lo que indica que es un complejo I de menor tamaño. Este valor es diferente al peso reportado para el complejo I de mamíferos ~900 KDa (Vinothkumar *et al.*, 2014), levaduras ~1000 KDa (Guerrero-Castillo *et al.*, 2009), algas verdes ~1000 KDa (Cardol *et al.*, 2004) y plantas ~900 KDa (Klodmann *et al.*, 2010), y deja abierta la posibilidad de investigar a fondo su estructura.

La identificación del complejo I mitocondrial fue posible con un análisis cuantitativo de espectrometría de masas. A partir de la muestra de membranas totales se identificaron 127 péptidos relacionados con la maquinaria de replicación, fotosíntesis, transporte, metabolismo glucolítico, el complejo I y complejo V mitocondrial, ciclo de los ácidos tricarbóxicos y otros que no fue posible identificar mediante los análisis realizados. De los 127 péptidos, 20 de ellos corresponden al complejo I de *P. tricornutum* y 5 al complejo ATP sintasa (Complejo V). De los péptidos correspondientes a la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, dos de ellos corresponden al dominio anhidrasa carbónica que concuerda con lo reportado anteriormente para *P. tricornutum* con inmunorreplacas tipo Western (Cainzos *et al.*, 2021) y el alga incolora *P. parva* (Sunderhaus *et al.*, 2006), lo que confirma la presencia de anhidrasa carbónica en el complejo I del grupo de las diatomeas.

En el análisis por espectrometría de masas no fue posible identificar algunas proteínas catalíticas del sector membranal y periférico posiblemente por la hidrofobicidad de las mismas o el procesamiento de la muestra. Se ha descrito que los resultados pueden cambiar por el sitio de corte de la tripsina o los factores de ionización de los péptidos (Walmsley *et al.*, 2013), sin embargo, con el gel 2D-3D-SDS se encontraron otros péptidos con pesos similares a los péptidos que están en la membrana, tal como se han observado con este tipo de geles en organismos como *Arabidopsis thaliana* y *P. parva* (Klusck *et al.*, 2021).

La suma del peso molecular de todos los péptidos identificados por espectrometría de masas resulta en un valor de 469.5 kDa, similar a la suma de los mismos péptidos identificados en el gel 3D-

SDS (426.9 kDa), la mayoría por debajo de los 55 kDa. Con el gel de tricina-SDS se obtuvieron alrededor de 30 péptidos, que es lo común reportado en este tipo de geles para el complejo I generalmente (Schägger y von Jagow, 1991).

Con respecto a las dos bandas que se encontraron al hacer la comparativa en los péptidos en ambas bandas se encuentran las mismas subunidades lo que indica que no se está rompiendo la enzima y que la banda de 1.1 MDa podría ser la asociación de un complejo I completo con las subunidades conservadas del transporte de electrones y la translocación de protones pero con un dominio extra de proteínas únicas en el linaje de los Stramenopila, similar a lo que se ha descrito para el complejo I de *Euglena gracilis* (dominio FAS) (Miranda-Astudillo *et al.*, 2018) y *Tetrahymena thermophila* (Mühleip *et al.*, 2023), ambos con nuevas subunidades especie-específicas que les confieren pesos moleculares mayores, 1.4 y 1.7 MDa, respectivamente.

No se descarta la idea de que la banda de mayor peso molecular podría ser un supercomplejo, en especial una asociación del complejo I con el complejo III tal como se ha propuesto antes para *P. tricornutum* (Cainzos *et al.*, 2021). Sin embargo, no se identificaron péptidos del complejo III por espectrometría de masas, aunque a nivel genético si se encuentran todos los genes codificadores para las enzimas de la fosforilación oxidativa (Bowler *et al.*, 2008).

De acuerdo con los resultados y lo descrito anteriormente, se construyeron los modelos estructurales por homología para los complejos I mitocondrial y ATP sintasa de *P. tricornutum* de acuerdo con las proteínas identificadas por espectrometría de masas (Tabla 4). Para la realización de los mismos se tomó como modelo a *P. parva* en el caso del complejo I y a *Bos taurus* para la ATP sintasa (Figura 25).

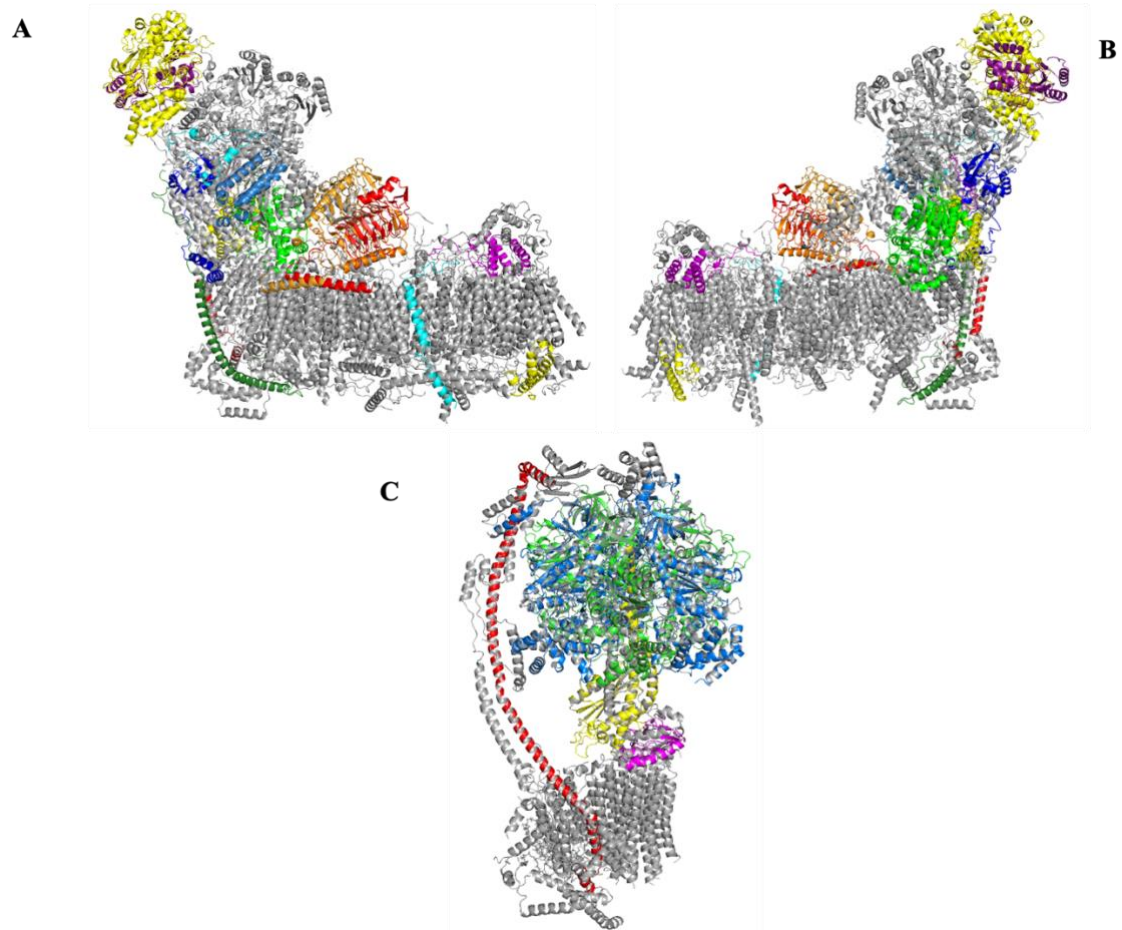


Figura 25. Modelo estructural por homología de los complejos I y V de la fosforilación oxidativa de *Phaeodactylum tricornutum*. A Complejo I con las subunidades: NDUFV1 (amarillo arriba), NDUFA9 (verde claro), gCA3 (rojo centro), NDUFA7 (cian brazo periférico), NADH1B (amarillo centro), NDUFB9 (magenta), NDUFA5 (azul cielo), gCA (naranja), NuoI/NADH1 (azul marino), NuoE/NDUV2 (purpura), NDUFA13 (verde bosque), NADUFA12 (magenta), MWFE/NDUFA1 (rojo abajo), NDUFB7 (amarillo abajo) y ESSS/NDUFB11 (cian abajo). B ATP sintasa con las subunidades: b (rojo), gamma (amarillo), alfa (azul), beta (verde) y delta (magenta).

VIII. Conclusiones

1. En el presente trabajo se logró la optimización para el crecimiento de *Phaeodactylum tricorutum* en el fotobiorreactor Antares I
2. Se confirmaron dos bandas con actividad de complejo I (NADH/NBT), una de 1.1 MDa y otra de 0.8 MDa.
3. Se logró la primera purificación del complejo I mitocondrial en diatomeas por cromatografía con un perfil polipeptídico de 27 péptidos entre 8 y 80 kDa.
4. Se identificaron 20 subunidades del complejo I mitocondrial mediante espectrometría de masas correspondientes al sector periférico y membranal de la enzima.
5. El complejo I de diatomeas tiene un peso molecular menor con respecto al complejo I de otros linajes de eucariontes y posee el dominio anhidrasa carbónica.
6. El complejo I mitocondrial contiene subunidades conservadas entre especies y probablemente subunidades linaje-específicas.

IX. Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. Garland Science, New York.

Bailleul, B., Berne, N., Murik, O. Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., Villanova, A., Bligny, R., Flori, S., Falconet, D., Krieger-Liszkay, A., Santabarbara, S., Rappaport, F., Joliot, P., Tirichine, L., Falkowski, G. P., Cardol, P., Bowler, C. & Finazzi, G. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Natur*, 524, 366–369. doi.org/10.1038/nature14599

Benoiston, A. S., Ibarbalz, F. M., Bittner, L., Guidi, L., Jahn, O., Dutkiewicz, S. & Bowler, C. (2017). The evolution of diatoms and their biogeochemical functions. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372: 20160397. doi.org/10.1098/rstb.2016.0397

Berges, J. A., Franklin, D. J. & Harrison, P. J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, 37: 1138-1145. doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x

Bialevich, V. Zachleder, V. Bišová, K. (2022). The Effect of Variable Light Source and Light Intensity on the Growth of Three Algal Species. *Cells*.: 11(8):1293. doi.org/10.3390/cells11081293

Boekema, E. J., Van Breemen, J. F., Keegstra, W., Van Bruggen, E. F., & Albracht, S. P. (1982). Structure of NADH:Q oxidoreductase from bovine heart mitochondria studied by electron microscopy. *Biochimica et biophysica acta*, 679(1), 7–11. doi.org/10.1016/0005-2728(82)90248-1

Borowitzka, M. A. & Volcani, B. E. (1978). The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. phycol.*, 14, 10-21.

Borowitzka, M.A. (2018). Biology of microalgae. En: Levine, A., Fleurence, J. (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, London, UK.

Böttcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L., & Friedrich, T. (2002). A novel, enzymatically active conformation of the Escherichia coli NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *The Journal of biological chemistry*, 277(20), 17970–17977. doi.org/10.1074/jbc.M112357200

Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kroger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jezequel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Oudot-Le Secq, M.P., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro,

H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van De Peer, Y., Grigoriev, I.V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456, 239–244. doi.org/10.1038/nature07410

Burki, F., Roger, J.A., Brown, M. W. & Simpson, A. G. B. (2020). The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(1): 43-55. doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008

Butler, T., Kapoore, R. V. & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricorutum*: A Diatom Cell Factory. *Trends in Biotechnology*, 38(6): 606-622. doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.023

Cainzos, M., Marchetti, F., Popovich, C., Leonardi, P., Pagnussat, G., & Zabaleta, E. (2021). Gamma carbonic anhydrases are subunits of the mitochondrial complex I of diatoms. *Molecular microbiology*, 116(1), 109–125. doi.org/10.1111/mmi.14694

Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R. F., & Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta*, 1658(3), 212–224. doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.06.001

Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J., & Walker, J. E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), 32724–32727. doi.org/10.1074/jbc.M607135200

Cerón García, M. C., Fernández Sevilla, J. M., Ación Fernández, F. G., Molina Grima, E., y García Camacho, F. (2000). Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 239-248. doi.org/10.1023/a:1008123000002

Cerón García, M. C., García Camacho, F., Sánchez Mirón, A., Fernández Sevilla, J. M., Chisti, Y., & Molina Grima, E. (2006). Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* on various carbon sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(5), 689-694.

Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Mitochondria.

Cooper, J. M. y Clark, J. B. (1994). The structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *Mitochondrial Disorders in Neurology*, Butterworth-Heinemann. doi.org/10.1016/B978-0-7506-0585-4.50006-X.

De Martino, A., Meichenin, A., Kehou Pan, S. & Bowler, C. (2007). Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (bacillariophyceae) accessions. *J. Phycol.* 43, 992–1009. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x

Degli Esposti M. (1998). Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et biophysica acta*, 1364(2), 222–235. doi.org/10.1016/s0005-2728(98)00029-2

Duarte, B., Feijão, E., Goessling, J. W., Caçador, I. y Matos, A. R. (2021). Pigment and Fatty Acid Production under Different Light Qualities in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Sciences*: 11(6):2550. doi.org/10.3390/app11062550

Efremov, R., Baradaran, R. & Sazanov, L. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465, 441–445. doi.org/10.1038/nature09066

Fan, L., Wu, D., Goremykin, V., Xiao, J., Xu, Y., Garg, S., Zhang, C., Martin, W. F., & Zhu, R. (2020). Phylogenetic analyses with systematic taxon sampling show that mitochondria branch within Alphaproteobacteria. *Nature ecology & evolution*, 4(9), 1213–1219. doi.org/10.1038/s41559-020-1239-x

Fiedorczuk, K., Letts, J. A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., & Sazanov, L. A. (2016). Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*, 538(7625), 406–410. doi.org/10.1038/nature19794

Flori, S., Jouneau, P. H., Finazzi, G., Maréchal, E., & Falconet, D. (2016). Ultrastructure of the Periplastidial Compartment of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*, 167(3), 254–267. doi.org/10.1016/j.protis.2016.04.001

Friedrich, T., & Böttcher, B. (2004). The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochimica et biophysica acta*, 1608(1), 1–9. doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.10.002

Fullerton, M., McFarland, R., Taylor, R. W., & Alston, C. L. (2020). The genetic basis of isolated mitochondrial complex II deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 131(1-2), 53–65. doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.09.009

Gao, X., Wen, X., Esser, L., Quinn, B., Yu, L., Yu, C. A., & Xia, D. (2003). Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*, 42(30), 9067–9080. doi.org/10.1021/bi0341814

Geiger, O., Sanchez-Flores, A., Padilla-Gomez, J., & Degli Esposti, M. (2023). Multiple approaches of cellular metabolism define the bacterial ancestry of mitochondria. *Science advances*, 9(32), 1-17. doi.org/10.1126/sciadv.adh0066

Gorai, T., Katayama, T., Obata, M., Murata, A., & Taguchi, S. (2014). Low blue light enhances growth rate, light absorption, and photosynthetic characteristics of four marine phytoplankton species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 459, 87–95. doi.org/10.1016/j.jembe.2014.05.013

Gramma, BS, Agathos, S., Jeffryes, C. (2016). Balancing photosynthesis and respiration increases microalgal biomass productivity during photoheterotrophy on glycerol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*: 4(3), 1611-1618. doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01544

Gray, M. W., Burger, G., & Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome biology*, 2(6), 1-5. doi.org/10.1186/gb-2001-2-6-reviews1018

Grba, D. N., & Hirst, J. (2020). Mitochondrial complex I structure reveals ordered water molecules for catalysis and proton translocation. *Nature structural & molecular biology*, 27(10), 892–900. doi.org/10.1038/s41594-020-0473-x

Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., & Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(2), 75–85. doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.008

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.

Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., & Yang, M. (2017). Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I₂III₂IV₂. *Cell*, 170(6), 1247–1257.e12. doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050

Heazlewood, J. L., Howell, K. A., & Millar, A. H. (2003). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et biophysica acta*, 1604(3), 159–169. doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00045-8

Kampjut, D., & Sazanov, L. A. (2020). The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6516), eabc4209. doi.org/10.1126/science.abc4209

Kampjut, D., & Sazanov, L. A. (2022). Structure of respiratory complex I - An emerging blueprint for the mechanism. *Current opinion in structural biology*, 74, 1-8. doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102350

Kampjut, D., & Sazanov, L. A. (2022). Structure of respiratory complex I - An emerging blueprint for the mechanism. *Current opinion in structural biology*, 74, 102350. doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102350

Khalimonchuk, O., Ostermann, K., & Rödel, G. (2005). Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Current genetics*, 47(4), 223–233. doi.org/10.1007/s00294-005-0569-1

Kirk, J.T.O. (1994) Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press, Cambridge.

Kitano, M., Matsukawa, R. & Karube, I.(1997) Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophila*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology*, 9, 559–563.

Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jänsch, L., & Braun, H. P. (2010). Internal architecture of mitochondrial complex I from Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, 22(3), 797–810. doi.org/10.1105/tpc.109.073726

Klusch, N., Senkler, J., Yildiz, Ö., Kühlbrandt, W., & Braun, H. P. (2021). A ferredoxin bridge connects the two arms of plant mitochondrial complex I. *The Plant cell*, 33(6), 2072–2091. doi.org/10.1093/plcell/koab092

Lehninger, A. L., & Wadkins, C. L. (1962). Oxidative phosphorylation. *Annual review of biochemistry*, 31, 47–78.

Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*, 24(10), 800–808. doi.org/10.1038/nsmb.3460

Lewin, J. C., Lewin, R. A., & Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of general microbiology*, 18(2), 418–426. doi.org/10.1099/00221287-18-2-418

Li, Y & Liu, J. Analysis of light absorption and photosynthetic activity by *Isochrysis galbana* under different light qualities. *Aquac Res.* 2020; 51: 2893–2902. doi.org/10.1111/are.14628

Mann, D. G., Crawford, R. M., Round, F. E. (2016). Bacillariophyta. En: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J., Corliss, J.O. (Eds.), *Handbook of the Protists*. Springer International Publishing, Cham.

Margulis, L. (1971). The Origin of Plant and Animal Cells: The serial symbiosis view of the origin of higher cells suggests that the customary division of living things into two kingdoms should be reconsidered. *American Scientist*, 59(2), 230–235.

Martin, W. & Mentel, M. (2010). The Origin of Mitochondria. *Nature Education*, 3(9):58

Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D. R., & Ryan, M. T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1817(6), 851–862. doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010

Miranda-Astudillo H. V., Yadav, K. N. S, Colina-Tenorio, L., Bouillenne, F., Degand, H., Morsomme, P., Boekema, E. J., Cardol, P. (2018). The atypical subunit composition of respiratory complexes I and IV is associated with original extra structural domains in *Euglena gracilis*. *Sci Rep.*, 8(1):9698. doi.org/10.1038/s41598-018-28039-z

Miranda-Astudillo, H., Ostolga-Chavarría, M., Cardol, P., & González-Halphen, D. (2022). Beyond being an energy supplier, ATP synthase is a sculptor of mitochondrial cristae. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1863(6), 1-10. doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148569

Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148. doi:10.1038/191144a0

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews*, 41: 445-501. doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01501.x

Mühleip, A., Flygaard, R. K., Baradaran, R., Haapanen, O., Gruhl, T., Tobiasson, V., Maréchal, A., Sharma, V., & Amunts, A. (2023). Structural basis of mitochondrial membrane bending by the I-II-III-IV₂supercomplex. *Nature*, *615*(7954), 934–938. doi.org/10.1038/s41586-023-05817-y

Nelson, D. L., David L., y Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. 7th Edition. W.H. Freeman. New York.

Ooms, M. D., Graham, P. J., Nguyen, B., Sargent, E. H., & Sinton, D. (2017). Light dilution via wavelength management for efficient high-density photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, *114*(6), 1160–1169. doi.org/10.1002/bit.26261

Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchen, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best practice & research. *Clinical endocrinology & metabolism*, *26*(6), 711–723. doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003

Paper, M., Glemser, M., Haack, M., Lorenzen, J., Mehlmer, N., Fuchs, T., Schenk, G., Garbe, D., Weuster-Botz, D., Eisenreich, W., Lakatos, M., & Brück, T. B. (2022). Efficient Green Light Acclimation of the Green Algae *Picochlorum* sp. Triggering Geranylgeranylated Chlorophylls. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *10*, 885977. doi.org/10.3389/fbioe.2022.885977

Prihoda, J., Tanaka, A., de Paula, W. B., Allen, J. F., Tirichine, L., & Bowler, C. (2012). Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *Journal of experimental botany*, *63*(4), 1543–1557. doi.org/10.1093/jxb/err441

Ritchie, R.J. (2006). Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynth Res* *89*, 27–41. doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9

Rodríguez-Bolaños, M., Vargas-Romero, G., Jaguer-García, G., Aguilar-Gonzalez, Z. I., Lagos-Romero, V. y Miranda-Astudillo, H. V. (2023). Antares I: a Modular Photobioreactor Suitable for Photosynthesis and Bioenergetics Research. *Appl Biochem Biotechnol*. doi.org/10.1007/s12010-023-04629-0

Roger, A. J., Muñoz-Gómez, S. A., y Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current biology*, *27*(21), R1177–R1192. doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015

Sánchez-Saavedra, M. P. y Voltolina, D. (2002). Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures. *Ciencias Marinas*: *28*(3): 273–279. doi.org/10.7773/cm.v28i3.225

Sazanov L. A. (2015). A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *16*(6), 375–388. doi.org/10.1038/nrm3997

Sazanov, L. A., & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5766), 1430–1436. doi.org/10.1126/science.1123809

Sazanov, L. A., & Walker, J. E. (2000). Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. *Journal of molecular biology*, 302(2), 455–464. doi.org/10.1006/jmbi.2000.4079

Schägger, H., & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, 199(2), 223–231. doi.org/10.1016/0003-2697(91)90094-a

Sharma, L. K., Lu, J., & Bai, Y. (2009). Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current medicinal chemistry*, 16(10), 1266–1277. doi.org/10.2174/092986709787846578

Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. (1972) A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd edition. Ottawa, Canada. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-1791>

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043–1057. doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025

Sunderhaus, S., Dudkina, N. V., Jänsch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E. J., & Braun, H. P. (2006). Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *The Journal of biological chemistry*, 281(10), 6482–6488. doi.org/10.1074/jbc.M511542200

Tesson, B., Gaillard, C. & Martin-Jézéquel, V. (2009). Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Botanica Marina*, 52(2): 104-116.

Thomas, P. E., Ryan, D., & Levin, W. (1976). An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 75(1), 168–176. doi:10.1016/0003-2697(76)90067-1

Trumpower B. L. (1990). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological reviews*, 54(2), 101–129. doi.org/10.1128/mr.54.2.101-129.1990

Villanova, V., Singh, D., Pagliardini, J., Fell, D., Le Monnier, A., Finazzi, G., & Poolman, M. (2021). Boosting Biomass Quantity and Quality by Improved Mixotrophic Culture of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Frontiers in plant science*, 12, 642199. doi.org/10.3389/fpls.2021.642199

Vinothkumar, K. R., Zhu, J., & Hirst, J. (2014). Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), 80–84. doi.org/10.1038/nature13686

Wallace, D. C., Lott, M. T., y Procaccio, V. (2013). Mitochondrial Medicine. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 1–153. doi:10.1016/b978-0-12-383834-6.00013-6

Walmsley, S. J., Rudnick, P. A., Liang, Y., Dong, Q., Stein, S. E., & Nesvizhskii, A. I. (2013). Comprehensive analysis of protein digestion using six trypsins reveals the origin of trypsin as a significant

source of variability in proteomics. *Journal of proteome research*, 12(12), 5666–5680. doi.org/10.1021/pr400611h

Whitehouse, D. G., May, B., & Moore, A. L. (2019). Respiratory Chain and ATP Synthase. Reference Module in Biomedical Sciences. *Elsevier*. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.95732-5

Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(7), 902–914. doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013

Wittig, I., & Schagger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, 5(17), 4338–4346. doi.org/10.1002/pmic.200500081

Wittig, I., Karas, M., & Schagger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 6(7), 1215–1225.

Yagi T. (1993). The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochimica et biophysica acta*, 1141(1), 1–17. doi.org/10.1016/0005-2728(93)90182-f

Yano, N., Muramoto, K., Shimada, A., Takemura, S., Baba, J., Fujisawa, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Tsukihara, T., & Yoshikawa, S. (2016). The Mg²⁺-containing Water Cluster of Mammalian Cytochrome c Oxidase Collects Four Pumping Proton Equivalents in Each Catalytic Cycle. *The Journal of biological chemistry*, 291(46), 23882–23894. doi.org/10.1074/jbc.M115.711770

Zaslavskaja, L.A., Lippmeier, J.C., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossman, A.R., Apt, K.E., (2001). Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292, 2073–2075.

Zerbetto, E., Vergani, L., & Dabbeni-Sala, F. (1997). Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 18(11), 2059–2064. doi.org/10.1002/elps.1150181131

Zhao, P., Gu, W., Wu, S., Huang, A., He, L., Xie, X., Gao, S., Zhang, B., Niu, J., Lin, P. y Wang, G. (2014). Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Sci Rep* 4, 3958. doi.org/10.1038/srep03958

Zhou, A., Rohou, A., Schep, D. G., Bason, J. V., Montgomery, M. G., Walker, J. E., Grigorieff, N., & Rubinstein, J. L. (2015). Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM. *eLife*, 4, e10180. doi.org/10.7554/eLife.10180

Zhu, J., Vinothkumar, K. R., & Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 536(7616), 354–358. doi.org/10.1038/nature19095

X. Anexos

Anexo I. Soluciones y protocolos

Medios de cultivo para *Phaeodactylum tricornutum*

Medio F/2. Preparar la cantidad a utilizar conforme la siguiente tabla:

Medio F/2	
Solución	1 litro
Instant Ocean	33-38 g
NaNO ₃	1 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1 mL
Oligoelementos	1 mL
Agua mili Q	Levar a 1 L

Esterilizar en autoclave 20 minutos

Antes de inocular agregar vitaminas 1 mL/L

Soluciones madre F/2	1 L
NaNO ₃	75 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g
Oligoelementos	
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.5 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	10 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	180 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3 g

Medio ESAW. Preparar la cantidad a utilizar conforme la siguiente tabla:

Medio ESAW	
Mezclar y esterilizar en autoclave	Para 1 L
Solución 2	100 mL
NaH ₂ PO ₄	1 mL
Metales	1 mL
Fe-EDTA	1 mL
Agua	796 mL
Esterilizar por filtración y agregar después	
Solución 1	100 mL
NaNO ₃	1 mL

Añadir vitaminas antes de inocular 1 mL/L

Soluciones ESAW

Solución 1	
NaCl	211.94 g/L
Na ₂ SO ₄	35.5 g/L
KCl	5.99 g/L
NaHCO ₃	1.74 g/L
KBr	0.863 g/L
H ₃ BO ₄	0.230 g/L
NaF	0.028 g/L
Solución 2	
MgCl 6H ₂ O	95.92 g/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	13.44 g/L
SrCl ₂ 6 H ₂ O	0.218 g/L
Macronutrientes	

NaNO ₃	46.67 g/L	
NaH ₂ PO ₄	3.094 g/L	
Metales		Solución madre 50 mL
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	3.09 g/100 mL	5 mL
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.73 g/100 mL	0.5 mL
CoCl 6H ₂ O	0.16 g/100 mL	0.5 mL
MnCl 4H ₂ O	0.54 g/100 mL	5 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.148 g/100 mL	50 µL
Na ₂ SeO ₃	0.017 g/100 mL	50 µL
NiCl ₂ 6H ₂ O	0.149 g/100 mL	50 µL
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.98 g/100 mL	50 µL
Fe-EDTA	3 g/L	

Vitaminas 1000x

Tiamina (Vitamina B1)	0.01%	10 mg/100 mL
Cobalamina (Vitamina B12)	0.0001%	0.1 mg/100 mL
Biotina	0.0001%	0.1 mg/100 mL

Pesar 10 mg de tiamina

Soluciones madre:

Pesar 10 mg de cobalamina y llevar a 1 mL, tomar 10 µL

Pesar 10 mg de Biotina y llevar a 1 mL, tomar 10 µL

Llevar a 100 mL y esterilizar por filtración. Hacer alícuotas de 1 mL y congelar a -20°C.

Preparación de membranas totales

1. Lavar un botón de células de un cultivo de 6 litros con 20 mL de amortiguador SHE (Sacarosa 0.25 M, HEPES 0.01 M, EDTA 0.001 M; pH 7.2). Centrifugar a 600 xg durante 20 minutos. Desechar el sobrenadante

2. Diluir el botón de células con amortiguador SHE a una concentración de 1.4×10^9 células/mL máximo. Repartir el volumen final en alícuotas de 4 mL
3. Aplicar 2 ciclos de 30 segundos de ultrasonido con una extensión de 3 mm de diámetro. Poner en amplitud al 50%, encendido y apagado 1segundo. Dejar reposar la muestra en hielo entre cada ciclo.
4. Centrifugar a 600 *xg* durante 20 minutos. Recuperar el sobrenadante.
5. Centrifugar a 13 500 *xg* durante 20 minutos. Recuperar el botón.
6. Resuspender el botón gentilmente (membranas) y guardar a -70° hasta su uso.

Amortiguador SHE pH 7.2	100 mL
Sacarosa 0.25 M	8.55 g
HEPES 0.01 M	0.238 g
EDTA 0.001 M	0.029 g

Cuantificación de pigmentos

1. Tomar 10 mL de un cultivo a mitad de la fase logarítmica de crecimiento.
2. Centrifugar a 2 195 *xg* durante 10 minutos.
3. Resuspender el botón de células en 1 mL de metanol absoluto frío y dejar reposar toda la noche a 4°C en oscuridad.
4. Centrifugar a 13 100 *xg* durante 10 minutos. Recuperar el sobrenadante.
5. Medir absorbancia como lo indican las ecuaciones para clorofila a ($\mu\text{g/mL}$) = $-2.6839 (A_{632} - A_{750}) + 13.2654 (A_{665} - A_{750}) (\pm 0.1097)$, clorofila *c* ($\mu\text{g/mL}$) = $-6.0138 (A_{665} - A_{750}) + 28.8191(A_{632} - A_{750})$ (Ritchie 2006) y carotenos ($\mu\text{g/mL}$) = $7.6(A_{480} - A_{750}) - 1.49(A_{510} - A_{750})$ (Strickland y Parsons, 1972).

Solubilización de membranas totales

1. Solubilizar 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con n-dodecil beta maltósido en relación 6:1 proteína:detergente de una solución madre al 10% de 100 mg/mL. Adicionar el volumen restante a 200 μL con buffer de solubilización
2. Incubar en hielo durante 1 hora (agitar con micropipeta cada 5 minutos)
3. Centrifugar a 13 100 *xg* durante 30 minutos.

4. Recuperar el sobrenadante
5. Preparar un gel azul nativo de poliacrilamida del 4-12%
6. Cargar varios carriles y realizar la migración electroforética
7. Realizar la zimografía en gel

Amortiguador de solubilización pH 8.4		100 mL
Tris	50 mM	0.308 g
NaCl	100 mM	584 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 mM	24.6 mg
Glicerol	10%	10 mL
Ácido aminocaproico	50 mM	0.655 g

Electroforesis

SDS-PAGE

Soluciones

Solución de carga pH 6.8		25 mL
SDS	10%	2.5 g
Glicerol	30%	7.5 mL
Tris	100 mM	1.25 g
Azul de Coomassie	0.3%	75 mg
Mercaptoetanol	4%	1 mL

Solución madre de acrilamida		100 mL
Acrilamida	30%	30 g
Bis-acrilamida	0.98%	0.98 g

Amortiguador electroforético		500 mL
Tris	3 M	181.7 g
HCl	1 N	40.3 mL
SDS	0.3%	1.5 g

Amortiguador cátodo		1 L
Tris	0.1 M	12.1 g
Tricina	0.1 M	17.9 g
SDS	0.1%	1 g

Amortiguador cátodo con azul de Coomassie		1 L
Tris	0.1 M	12.1 g
Tricina	0.1 M	17.9 g
SDS	0.05%	0.5 g
Azul de Coomassie (SERVA Blue G)	0.05%	0.5 g

Amortiguador ánodo pH 8.9		1 L
Tris-HCl	0.1 M	12.1 g

Solución teñidora		1 L
Etanol	50%	500 mL
Ácido acético	10%	100 mL
Coomassie R-250	0.1%	1 g

Solución desteñidora		1 L
Metanol	50%	500 mL
Ácido acético	10%	100 mL

Soluciones SDS glicina (Laemmli)

Amortiguador cátodo y ánodo pH 8.3		1 L
Tris	0.025 M	3.028 g
Glicina	0.192 M	14.41 g
SDS	0.1%	1 g

Mezclas para los geles SDS-PAGE Tricina (von Jagow)

	Gel separador			Gel concentrador
	10%	12%	14%	4%
Solución madre de acrilamida 30%	2.5 mL	3.0 mL	3.5 mL	400 uL
Amortiguador electroforético	4 mL	3.5 mL	3.0 mL	800 uL
Glicerol 79.5%	1 mL	1 mL	1 mL	
Agua				1.85 mL
Persulfato de amonio 10%	40 uL			40 uL
TEMED	5 uL			5 uL

Mezclas para los geles SDS-PAGE Glicina (Laemmli)

	Gel separador	Gel concentrador
	12%	3%
Solución madre de acrilamida 30%	3.95 mL	300 uL
Tris 1.5 M pH 8.8	2 mL	
Tris 0.5 M pH 6.8		90 uL
SDS 10%	100 uL	30 uL
Agua	4 mL	2.6 mL
Persulfato de amonio 10%	50 uL	20 uL
TEMED	5 uL	3 uL

BN-PAGE

Soluciones

Solución madre de acrilamida		100 mL
Acrilamida	40%	40 g
Bis-acrilamida	1.2%	1.2 g

Solución madre de acrilamida		100 mL
Acrilamida	48%	48 g
Bis-acrilamida	1.5%	1.5 g

Amortiguador 3X pH 7.0		100 mL
Ácido aminocaproico	1.5 M	19.4 g
Bis-Tris	150 mM	3.14 g

Amortiguador cátodo pH 7.0		1 L
Bis-Tris	15 mM	3.14 g
Tricina	50 mM	8.96 g
Azul de Coomassie (SERVA Blue G)	0.004%	40 mg

Amortiguador ánodo pH 7.0		1 L
Bis-Tris	50 mM	10.46 g

Amortiguador de carga pH 7.0		50 mL
Ácido aminocaproico	750 mM	4.92 g
Bis-Tris	50 mM	0.52 g
Azul de Coomassie Serva G en amortiguador de cátodo	5%	2.5 g

Mezcla para los geles BN-PAGE

	Gel separador		Gel concentrador
	4%	12%	4%
Agua	2.28 mL	0.56 mL	1.775 mL
Amortiguador 3X	1.508 mL	1.508 mL	1 mL
Solución madre de acrilamida 48%	0.372 mL	1.12 mL	0.225 mL
Glicerol 80%	0.322 mL	1.285 mL	
Persulfato de amonio 10%	20 uL		
TEMED	5 uL		

Zimografía en gel de los complejos respiratorios

1. Cortar las bandas de interés y lavar en la solución correspondiente

Complejo I. NADH/NBT oxidoreductasa

2. Colocar las bandas en 20 mL de amortiguador Tris 10 mM; pH 7.0 (1.211 g/L)
3. Adicionar 100 μ L de una solución NADH 100 mM
4. Adicionar 100 μ L de una solución de NDT 15 mg/mL
5. Incubar 15-30 minutos con agitación leve
6. Fotografiar el gel en el momento
7. Detener la reacción incubando en una solución de metanol al 50%

Complejo III. Citocromo c reductasa

2. Lavar con agua durante 5 minutos.
3. Incubar en una solución 3:7, TMBZ 6.3 mM*:acetato de sodio 250 mM, pH 5.0. Mezclar ambas soluciones justo antes de usar. Ambas deben estar a 4° C.
4. Dejar en la oscuridad durante 1-2 horas, con agitación cada 15 minutos.
5. Agregar H₂O₂ a una concentración final de 30 mM (495 μ L para 100 mL).
6. Incubar 5-30 minutos
7. Eliminar el fondo del gel con una solución 3:7 isopropanol: acetato de sodio 250 mM, pH 5.0. Cambiar una o dos veces. El gel se almacena en esta solución.
8. Se puede escanear el gel a 690 nm 1 h o hasta 2 días después almacenados con la solución isopropanol:acetato de sodio. Almacenar en oscuridad.

* En metanol frío y en oscuridad, preparar con tiempo porque tarda en disolver y cubrir con aluminio.

Complejo IV. Citocromo c oxidasa

2. Incubar las bandas en 20 mL de solución de fosfatos 50 mM; pH 7.4
3. Adicionar 250 μ L de una solución de citocromo c de corazón de caballo 10 mg/mL
4. Adicionar 250 μ L de una solución de 3,3' diaminobencidina tetrahidroclohidrato 20 mg/mL
5. Incubar 1-2 horas en agitación leve

6. Fotografiar el gel en el momento
7. Detener la reacción incubando con solución de metanol 50%

Complejo V. ATP sintasa (hidrólisis de ATP)

2. Incubar las bandas en amortiguador de glicina 270 mM, Tris 35 mM: pH 8.4 durante 3 horas
3. Cambiar las bandas a un amortiguador de glicina 270 mM, Tris 35 mM, MgSO₄ 14 mM, Pb(NO₃)₂ 0.2%; pH 8.4 durante 15 minutos
4. Agregar 100 mg de ATP disuelto al momento en 1 mL del amortiguador del punto 2
5. Incubar 4-12 horas con agitación leve
6. Escanear el gel en el momento
7. Detener la reacción incubando con solución de metanol 50%

Tinción de plata para geles de poliacrilamida

1. Incubar el gel toda la noche con 50 mL de solución fijadora
2. Lavar 5 minutos con etanol al 50%. Repetir 3 veces
3. Incubar con 100 mL de solución de tiosulfato de sodio preparada al momento
4. Lavar 10 segundos con agua. Repetir 3 veces
5. Incubar 1 hora con 50 mL de nitrato de plata
6. Lavar un minuto con agua, dos veces
7. Incubar con solución reveladora hasta obtener la intensidad de bandas deseada
8. Detener la reacción con ácido acético hasta que pare el burbujeo
9. Fotografiar el gel en momento

Soluciones	100 mL
Fijadora	
Metanol	50 mL
Ácido acético glacial	12 mL
Formaldehído	50 μ L
Solución de tiosulfato	
Tiosulfato de sodio 200 μ g/mL	20 mg
Solución de nitrato de plata	
Nitrato de plata	0.2 g
Formaldehído 37%	75 μ L
Solución reveladora	
Carbonato de sodio	6 g
Formaldehído 37%	50 μ L
Solución de tiosulfato	2 mL

Purificación de Complejo I

Preparar las siguientes soluciones y filtrar con filtros de 0.22 μm . Guardar a 4°C hasta su uso.

Agua

Etanol al 20 %

Soluciones		100 mL
NaCl	2 M	11.6 g
NaOH	1 M	5 g

Preparar todo el volumen de amortiguador A, ajustar pH y separar el volumen de amortiguador B y Superose a utilizar. Agregar la cantidad de NaCl correspondiente para cada uno. Filtrar por separado y guardar.

Amortiguador A pH 8.4		
Tris	50 mM	0.608 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 mM	36 mg
Glicerol	10%	10 mL
PMSF	1 mM	17.4 mg
TLCK	50 $\mu\text{g/mL}$	5 mg
Lauril maltósido beta	10%	1 g
NaCl	15 mM	0.087 g
Amortiguador B pH 8.4		
NaCl	500 mM	2.92 g
Amortiguador Superose pH 8.4		
NaCl	150 mM	0.87 g

Solubilizar membranas totales con beta maltósido durante 1 hora y centrifugar a 14 000 rpm durante 40 minutos.

Recuperar el sobrenadante y diluir 1:3 con amortiguador A

Cromatografía de intercambio aniónico (Source 15Q 10/100 GL)

Realizar todo el procedimiento a 4°C y tomar en cuenta la presión máxima de la columna: 2 Mpa.

Los lavados y equilibrio del equipo/columna se realizan hasta obtener una línea base.

En FPLC

1. Equilibrar las bombas con el amortiguador correspondiente
Bomba A. Amortiguador A
Bomba B. Amortiguador B
2. Equilibrar el equipo (mangueras y detector) con amortiguador A
3. Conectar la columna
4. Equilibrar la columna Source 15 Q 10/100 GL (8 mL) con amortiguador A
5. Cargar la muestra a la columna por la bomba A o por la válvula de inyección (manual).
6. Lavar la columna hasta la línea base con amortiguador A
7. Eluir la proteína con un gradiente 0 a 100% de amortiguador B en 20 volúmenes de columna a un flujo de 1.5 mL/min
8. Colectar fracciones de 0.5 mL
9. Visualizar las fracciones en geles de poliacrilamida azules nativos y hacer actividad de complejo I para seleccionar las fracciones enriquecidas con la proteína de interés.
10. Congelar las alícuotas enriquecidas a -70°C hasta su uso.

Cromatografía de exclusión molecular (Superose S6 10/300 GL)

Concentrar las fracciones enriquecidas con CI de la columna Source 15Q con un filtro para centrifuga Centricon de 100 kDa hasta 500 µL

Realizar todo el procedimiento a 4°C y tomar en cuenta la presión máxima de la columna: 1.5 Mpa

En FPLC

1. Equilibrar las bombas con amortiguador superose a un flujo de 0.5 mL/min
2. Equilibrar las mangueras y la columna
3. Cargar la muestra (500 μ L) a la columna por la válvula de inyección (manual).
4. Lavar la columna hasta la línea base con amortiguador A
5. Eluir la muestra a un flujo de 0.25 ml/min
6. Colectar fracciones de 0.5 mL
7. Visualizar las fracciones en geles de poliacrilamida azules nativos y hacer actividad de complejo I.
8. Congelar las alícuotas enriquecidas a -70°C hasta su uso.

Limpieza de la columna Source 15Q

Colocar la columna en flujo reverso y colocar la presión máxima en 2 Mpa y velocidad de flujo a 1-2 mL/min.

1. Lavar con agua
2. Lavar con NaCl 2 M para eliminar la muestra unida por uniones iónicas
3. Lavar con agua
4. Lavar con NaOH 1M
5. Lavar con agua
6. Lavar nuevamente con NaCl 2 M
7. Lavar con agua
8. Pasar isopropanol al 30% para retirar interacciones hidrofóbicas
9. Lavar con agua
10. Lavar y guardar la columna en etanol al 20%

Anexo II. Secuencias identificadas por espectrometría de masas

> Phatr3_J43944 (NDUFV1)

MMILSSTAARATAKALSRPGSRALASQAEHNLTSGFNFLSDQDR IFTNLYGEQDWR LPD
AIKRGDYHLTKIEMCMGPDWIIQEIKDSGLRGRGGAGFPSGLKWSFMPKETDGRPSFLV
VNADESEPGTCKDREIMRKPDPKLIIEGCILAGYAMRARAAYIYIR GEYFNEAVVLDEAI
HEAYAAGLLGK NACGSGYDYDIYLHRGAGAYICGEETALIESLEGKQGKPRLLKPPFPAG
VGLFGCPSTVTNVETVAVAPTILRR GASWFASFGNENNR GTKLFAISGHVK NPMVVEES
MSIPLR DLIDKHCGGMRNGWESVQACIPGGSSVPVLNKDQCGEALMEFDDLRAK GSGL
GTAAVTMFDNTVDMVGAIR RLSHFYKHESCGQCTPCR EGTGWLEDILIR MEKGDADKR
EIPMLEEISR QIEGHTICALGDAAAWPVQGLLRHFKKDIEDRIDNPKGFDHEAAAFQK AWS
GDPFDNNAWTK EHGDKGKTYAAA

Total 493
25.15%

> Phatr3_J17671 (NDUFA9)

MTIAMTMFAATQATARQNLLVCGRRSLSNFYSPKLTERRVGEAGSGGHSSEAGVKVALF
GASGFLGNYVCGELGANGFMAYLANRGDDMEMRHLKIPFDLGRTR FQFYSR DRDSIK
EVIQDADVVMIGK YYESGQPIQTAK FPYVGYRTNYSFADANVEIPR TLAEICLEMQV
DHFVHVSSASAPDARSEWSRTKYAGEQAIKEVYPWATIIRPTQFFGKQDRFLHWFARM
AKWYRIVPLVDGGK TLTQPWAGDVAK TILKVCNPSIFEGRQIDCFGPAEFSYSELADF
VNDITER NRPVFNLPYDYAAIAK VLQYQR DPLITPDLVEIWSDFLPSMPPEEYK LQKY
EQTK ILMQDLGIEPTPIEK IAFEFMQIYR AGGHFARVQGYH

Total 397
31.5%

> Phatr3_EG02042 (gCA3)

M SSLVAR ASNGLAGMMRKVGSADFDSMGKGLEITKYTEKLVPSR FVAVDGMVPK ISDK
GAFVAPSAAVIGDVTIGK ASSIWYGATVR GDVNTITIGDYNIGDR AVVHVAR IQGDFAT
SIGNNVTIGAGALIHAATLK DNCVVGESAQVLDGATVESNVIIAPAAIVTPGTMVPSGEL
WAGSPAKMIR VLTEDEIAAIPK QASETAALASMHAIEHSK SYEQVMEEEQVAENELYRE
VPVPK QTENPLGDVLGQGMPPGR IFRSTLSHPEDIYKGGQPK

Total 278
57.6%

> Phatr3_J48909 (NDUFA7)

MTITVRKAAEGVAKVVGQKAAAPHAATAKISLRSPRAVTLAEAKADAIQPARESTKTTM
TPWRGWFERVLQEVI GEERVKKIKDTMLFMPDDIYDLEQSPKPSQKIPISKTDPTITAMY
RYPSPGSQESVRIPEFENGKDPYDTGYFKRDTRRRYQFEELGDPDIEKAKLELMDPNDPQ
VQEDKKRVEAGPASSPGNKGVFATGPSDFDPTGLRATMSVTWSELNKSLEDAHMPDHL
TPTWMKDKEAIIAWHKERDLPVPVGPVYEGKVPVYLRVARW

Total 278
53.96%

> Phatr3_J41645 (NuoB)

MIASKSASWIRTGARGAALFVGPRVSTTSPSFGFAVRSMAGTAQSQTSALNRLNVEQ
MMQGGGNVPTADNVEYAIRVDDLNVNWARKGSLWPMTFGLACCAVEMMHAAASRY
DMERFGMVFRASPRQSDVMIVAGTLTNKMAPALRKVYDQMPEPRWVSMGSCANGG
GYYHYSYSVVRGCDRIVPVDIYVPGCPPTAEALLYGLIQLQKKVKGNKGLLLRLRK

Total 226
28.31%

> Phatr3_J48767 (NDUFA4)

MLTARTFLRSTLSLPQQRHAWESTGVRTLSSKKPVAPATAKAAVEEDVISPVTVRRAKM
SKIDRNMVFGTTGKFLAPVLPENPAEISALDPADQGHR LKMDGTARVVMIRQERASNR
QSPLKHEKYWRIFFYEDGMVAEKWTNSLMGWTSNGDPYQSAPPLIFPNAADAVYFAK
KRGNWFVVKQPIMRDPREDGAQYQDNFLPLAVAARVQKEGVSCDQWARDHAGTSSY
FRPLKYHGDGLVPQHGPNGNAPIAKHVPGYYKLR

Total 264
28.4%

> Phatr3_J11305 (NDUFB9)

M TLV RPQPLNDIFLAAANQTRQKARSLTHNQVAHLYRHSLRVLLSWAVDRDIFNEAA
TELRARFDAQRGVSAAAASRLKEGDDELFSFTHDPYKCVYMPGGSKFMRNPPLPME
VCFPDGNLPADAPRYTVNPDMSLCTPETGRNAVGTVLVDFYKKNME

Total 162
42.0%

> Phatr3_J49313 (NDUFA5)

MNALRLLRGACRPALASRFIVAPRTVPVRRFFSDASSTQSKPIIPGIGKGTSTGIVGLK
V
EPDWYNVMLNRFQALLDKMEASDMPETAQYRIDVTKWCNFVIRAVKSNPEDPEAVEE
TVQMGQVEELIEMAEMIALDTYLRTRMWELVEATNTVYDFEHDPMKDPMGK
DGD
DLAEAIRRGVDAMKTQKEN

Total 194

35.05%

> Phatr3_J24069 (gCA)

MAKQSVSKAVTAYLGRALRETGAALKHRGEMEFSRHRPKMTFLGKVPFVTNDTFIAPS
ASVIGDVTNWDQSSVWYKAVVRADSEHSITIGFCSSVGEGTVVNTLSSTGQLETGLPPD
TYIGHYVTVGAGCVLKSCRVDDLVVVGDKCTILEGSLVENHVILKPGTVVMPYQRIPSG
QMWAGNPAAFVSELTPEDEKEDIQQALKIFTSTKEHILEFLPYGRTFVHLEELEKQAGLE
VKQG

Total 241

49.79%

> Phatr3_J14260 (NuoI)

MSLSAVLHRSTLVSASKRLGSASGSARAFSTKHNDLERMEQKENILPTPWSEILDNSSRIF
FLTEIARAWWLAGEVFLKPRVTINYPYEKGYLSPRFRGEHALRRYPSGEERCIACKLCEA
ACPAQAITIEVQEREDGARRTTRYDIDMTKCIYCGFCQEACPVD AIVEGPNFEFATETHE
ELLYDKEKLLSNGDKWERQIAKNLMHEHLYR

Total 212

22.64%

> Phatr3_J22919 (NuoE)

MLSRFGASRFASKLSPVIRSQSRTFAGQKPFHIDTPENNLEVHFDFTLENYDRVKYIMAK
YPNNYKQAAMIPLDLAQRQHGGWLPLTAMHKVAAICEVAPVRVYEVASFYTMFNRN
PVGKYFIQLCGTTPCMICGSEDIKQTIEKHLGIKNGETTKDGLFTLLEVECLGACANAPM
VQLNDDYYECLTPDTTIALLESCKAGNPPAMGKWGSLPMNGQVSCEGPKGKTSLK
EIV
VPVVDKTRFEKGEVDPKIKKLMAY

Total 260

8.46%

> Phatr3_EG02174 (Rieske-like)

MKLAIVVALISSVAAFTAPLNTASKSSSTALNMAGLFKPALKYVPCIPLSELPKPGSATSGI
AGGLAICIAVDKKGSVYALGDKCPPVNQPLSFGK VNPDGTIQDPVLGTK FSLKTGDVVG
AWCPSGIGK LLGGAFTPSGVPTYVVRQR GGSLEVQVDVNYK ANFEKSYWTGVLDAQG
KSDGTY Y

Total 184
24.45%

> Phatr3_J46858 (21 KDa)

MSADASSFLLLSAGASRTPKRRIDSKK SIINLLTSSVEK QNRAMPRQAPPYAPVKPSPTID
DCIRSLRLSDYCQWAGSTIALWGYGFIVGKPARFAIAGMMAGIGFTFGSMVVLQNTRGR
LMGYRENSREVKR FGAADPDHVFTAEDLFQPNMDWK KQN

Total 159
22.01%

> Phatr3_J28620 (NDUFA13)

MSFRPDTSAPPIQDMPPPGGFPAVDLKR TARARGPSGGTIWAVASLSIAYGMYRLGQQN
RERATEMFEERKSR YAVAPILQAEEDKWYAER EADITAKEAEIMK NVSGWKAGESVYH
STNRWVPRPVMPLNKNLKK

Total 136
22.79%

> Phatr3_J34392 (NDUFA12)

MVWQAANNLR QALKYRGGWKGLLEHMYTNGDYPFKFGTYMGCDAMGNRYENRID
YFPGQHRWVEPANIHDSTHIPPEWHGWMVSMNDATPSLEQEYIDKMSKHTIKGEISH
APYQSNIGHQEPYFNFMHNQSQIRSR GYGIGNHV VGLPPGAPDAYYTQPGSPYNEAS
IRKFEMQGLDEKRAYKSEMWRQRLMTVAEK AAIEQSEKDEWTKPFEVAK TAKRLSL
REQAILARGGTL SK

Total 244
25.4%

> **Phatr3_J20948 (Cyt c)**

MSEKKGAKIFKTKCSQCHTVEEGGSHKQGNLYGFFGRQSGQADGYSYSAANKKSGIT
WGEDTLFEYLENPKKYIKGTK **MIFAGLK**KEKDRK **DLIAYLK**STCTA

Total 104
13.46%

> **Phatr3_EG00810 (MWFE)**

MPLQAAFTLFIIGGAFCTTGALIGGANWLYEGRRRR **MVEVDVWHTASQR**DMLIDRMR
KESAKEKQRLEGRTE

Total 73
19.17%

> **Phatr3_EG01582 (NDUFA3)**

MPHWDGHEVSFVTSIGGAFYLFHRTLPGWMRGFIHRQPIAAMSVVWAITGMTLPLVV
PPIRR **ALNLPTNQYDASHPNATFPK**YTY

Total 86
23.25%

> **Phatr3_EG00870 (NDUFB7)**

MGGGDHHHSPAAMPVEK **QDLDLLR**KHQVPLAYRDTCAHLLVDLNICRRETYYNPGAC
QHQRHTYEECGYIAWLRRVKELKAAEAAAAAAAAEAADTK

Total 98
7.1%

> **Phatr3_J35156 (ESSS)**

MFTFSRLAARRVATSTRRNMAEMPVPQSRNAKLWEGHPTNEGWETTVMWLYPVSVIL
FAAAHGLAPETGIRAWAQQEARARLELKAQGK **VDFEFGK**HYQNLEKNQEGSWDKFTE
KAVRMTDEDDDDDDDE

Total 130
5.4%

Anexo III. Artículo publicado

Applied Biochemistry and Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s12010-023-04629-0>

ORIGINAL ARTICLE



Antares I: a Modular Photobioreactor Suitable for Photosynthesis and Bioenergetics Research

Mónica Rodríguez-Bolaños¹ · Gloria Vargas-Romero¹ · Girian Jaguer-García¹ · Zhaida I. Aguilar-Gonzalez¹ · Verónica Lagos-Romero¹ · Héctor V. Miranda-Astudillo¹

Accepted: 1 July 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Oxygenic photosynthesis is responsible for most of the fixation of atmospheric CO₂. The microalgal community can transport atmospheric carbon into biological cycles in which no additional CO₂ is created. This represents a resource to confront the actual climate change crisis. These organisms have evolved to adapt to several environments and different spectral distribution of light that may strongly influence their metabolism. Therefore, there is a need for development of photobioreactors specialized in addressing spectral optimization. Here, a multi-scale modular photobioreactor made from standard glass materials, ad hoc light circuits, and easily accessible, small commercial devices is described. The system is suitable to manage the principal culture variables of research in bioenergetics and photosynthesis. Its performance was tested by growing four evolutionary-distant microalgal species with different endosymbiotic scenarios: *Chlamydomonas reinhardtii* (Archaeplastida, green primary plastid), *Polytomella parva* (Archaeplastida, colorless plastid), *Euglena gracilis* (Discoba, green secondary plastid), and *Phaeodactylum tricornutum* (Stramenophiles, red secondary plastid). Our results show an improvement of biomass production, as compared to the traditional flask system. The modulation of the incident light spectra allowed us to observe a far-red adaptation in *Euglena gracilis* with a difference on paramylon production, and it also significantly increased the maximal cell density of the diatom species under green light. Together, these confirm that for photobioreactors with artificial light, manipulation of the light spectrum is a critical parameter for controlling the optimal performance, depending on the downstream goals.

Keywords Photobioreactor · Microalgae production · Spectrum optimization

Featured Application: This work describes the design and construction of a low-cost equipment for microalgal culture in laboratory conditions. The described system allows the evaluation of the fundamental parameters for bioenergetics and photosynthesis research in several phylogenetically-distant species of microalgae.

✉ Héctor V. Miranda-Astudillo
hmiranda@iibiomedicas.unam.mx

¹ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Published online: 24 July 2023

Springer

Introduction

Climate change is an ongoing process that will change the relations between all living organisms on Earth. Normally, more than 90% of planetary carbon is stored in algae, vegetation, and coral reefs as biomass or organic compounds; besides, the actual accumulation of gaseous CO₂ in the atmosphere produced by human activity intensifies the greenhouse effect, which has increased the average temperature of the planet over the last few decades [1]. As primary producers and capable of performing photosynthesis, microalgae absorb sunlight (photons) and convert inorganic carbon (from the atmosphere or industrial emissions) into organic carbon biomass. Thus, an exponential advance in research for alternative energies, e.g., biofuels (in contrast to fossil fuels), and efforts to increase atmospheric CO₂ fixation have been achieved over the last decades [2]. However, nature developed this strategy a long time ago during the so-called Great Oxidation Event, which occurred about 2.4 billion years ago, when ancestors of cyanobacteria dramatically changed the environment massively fixing atmospheric CO₂ and using sunlight energy to produce organic matter and O₂ [3]. More complex photosynthetic organisms arose later by different endosymbiotic events. The first was the engulfment of a cyanobacterium by a heterotrophic eukaryote. From that, the three contemporary algal lineages emerged: chlorophytes, glaucophytes, and rhodophytes. Red algae (rhodophytes) appeared around 1.2 billion years ago, and green algae (chlorophytes) circa 0.75 billion years ago [4]. Molecular evidence suggests that glaucophytes were the earliest to branch off from the common ancestor [5]. Members of the chlorophytes and rhodophytes were then engulfed by independent eukaryotic hosts resulting in lineages with secondary plastids [6]. These events gave rise to an extensive variety of relations between newly born organelles and the hosts. Consequently, these organisms evolved to adapt to several environments and light qualities. The sequestration of CO₂ in microalgal systems has some advantages like better efficiency in light utilization, higher growth rates, and larger biomass production, as compared to terrestrial plants [7], e.g., to produce 1 kg of microalgal biomass, 1.83 of kg carbon is used [8]. These values illustrate that microalgae represent an interesting alternative to antagonize the ongoing crisis in climate change [9].

During the last decades, research to increase production of biomass has led to construct large open cultivation facilities and indoor photo bioreactors (PBR) [10–12]. With the advent of novel molecular engineering tools to improve the capacity of CO₂ fixation [13] or the production of high-value metabolites, e.g., vitamins, pigments, and fatty acids [14–17], several cultivation conditions need to be tested. The main variables that need to be overseen during microalgae cultivation are temperature, light intensity, air/CO₂ intake, and light spectrum quality control. Most of the available commercial PBRs control one, or more, of these variables. Nevertheless, multi-scale bioreactors for screening purposes and comparative studies are lacking, especially those that allow light spectrum control. The aim of this work was to develop a scalable, low-cost PBR and validate its suitability to control the main physical parameters, focusing on performing subsequent bioenergetic and photosynthesis research.

System Design

Figure 1 shows a schematic illustration of the modular PBR. Several small devices are combined into the scaffold of the modular system to feed and maintain the central growth glass vessels (1.7 and 7.5 L) (Fig. 1). The featured system regulates temperature, light intensity, CO₂/air injection, and light spectrum. For convenience, the full system will be

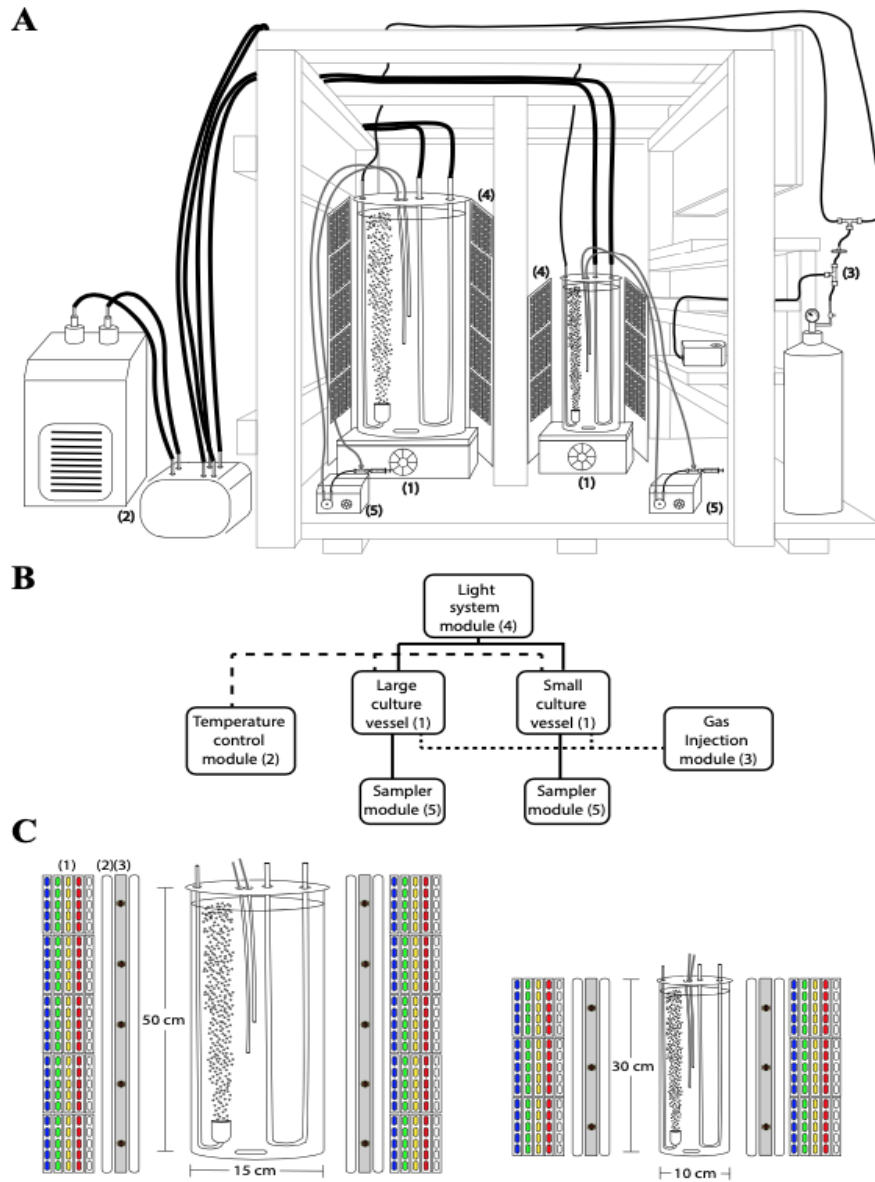


Fig. 1 Schematic representation of the modular photobioreactor Antares I. **A** Diagram of the complete system in the scaffold. For clarity the system is divided into five modules: (1) culture vessels, (2) temperature control, (3) gas injection, (4) light system, and (5) sampler module. **B** General instrumentation scheme of the modular photobioreactor; the connectivity of the different modules is shown. Numbers indicate the same modules shown in panel A. **C** Scheme of the light system distribution surrounding each culture vessel. (1) 0.5W 5630-type LEDs. (2) FLCLED 7 W/45 cm. (3) 3-W LED far-red (720–730 nm). Please refer to point 2 in text for details

divided into minor modules for description: temperature, gas injection, light system, and sampler modules. Agitation inside each vessel is achieved using a combination of magnetic stirrer/gas-column flow which guarantees the homogeneity of the culture. Details from each component of the system are described in supplemental Table 1.

Temperature Regulation Module

A 24-L water tank connected to a C-250 water chiller (*Boyu*) regulates the temperature (16–35 °C) of the whole system. A SP-2500 water pump (*Boyu*) recirculates the liquid (1400 L/h) from the tank to the refrigeration system and back (Fig. 1, panel A(2)). Two extra SP-1800 water pumps (*Boyu*) inject water (700 L/h) through individual glass heat interchanger U-tubes inside each culture vessel (Fig. 1, panel C).

Gas Injection Module

The two culture vessels can optionally be fed with air and/or CO₂. Two A-807 air pumps (*Elite-Hagen*) or an in situ CO₂ generator (*ZRDR*) injects the corresponding gas to the vessels. The injected gases are sterilized using a 0.22- μ m PVFD filter (Corning) connected to each pipeline (Fig. 1, panel A(3)). A GA-105 ceramic/glass CO₂ Atomizer (*Dymax*) disperses the gas flowing into the media (Fig. 1, panel C). The gas injection is measured with a bubble counter (*ZRDR*) and the volume/time flow (μ L/s) is calculated according to [18].

Light System Module

The ad hoc light system consists of the following: a primary system formed by four 4000-K white LED lamps per vessel (FLCLED 4W/25 cm) for the small vessel and four 4000-K white LED lamps (FLCLED 7W/45 cm) for the larger one. Spectral modification is accomplished by two larger groups of 12-V 0.5-W 5630-type color LEDs, blue (455–465 nm), green (515–525 nm), and red (635–645 nm). Six modules (5 LEDs/module) per color surround the small vessel and ten modules the larger one (Fig. 1, panel C). Additionally, sixteen 3-W LEDs far-red (720–730 nm) surround the culture vessels, 10 LEDs for the large and 6 for the small vessel, respectively. Optionally, 2700–3000-K and 5500–6500-K LED modules are used to maintain a basal illumination for the rest of the spectrum (Fig. 1, panel A(4) and panel C). An electrical diagram of the ad hoc light system is shown in Figure S1. Emission spectra from all the light sources were acquired with a Plano-Convex lens Collimator coupled to a SMA-E Spectrometer (*Thunder Optics*, France), using the Spectragryph acquisition software (<https://www.effemm2.de/spectragryph/index.html>).

Sampler Module

A peristaltic pump (*Intlab*) recirculates the culture through a sterile heat-resistant silicon tube (3-mm internal diameter). A sterile syringe, connected with a 3-way Luer lock, is used to collect 1 mL of sample each time (Fig. 1, panel A(5)).

Material and Methods

Algal Strain Cultures and Membrane Preparation

Chlamydomonas reinhardtii cell-wall-less mutants *cw15 mt+* were grown in continuous light conditions, illuminated with a 4000-K white LED lamp at an intensity of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm). The liquid mineral Tris-minimum-phosphate medium (TMP) pH 7.0 [19] was supplemented with a mix of vitamins (biotin $10^{-7}\%$, B12 vitamin $10^{-7}\%$, and B1 vitamin $2 \times 10^{-5}\%$ (w/v)). The culture was fed with a continuous air injection of 20 $\mu\text{L/s}$. Cells were collected at the middle of the logarithmic phase by a 10-min centrifugation step at $7000 \times g$ and stored at -70°C until use. All the following steps were performed at 4°C . The resulting cell pellet was resuspended in MET buffer (280 mM mannitol, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7, and 0.1% BSA) and then disrupted by sonication two times (30 s each, setting 5 W, 50% output) using a Branson-450 sonifier, as described in [20]. Total membranes were obtained by differential centrifugation, $3000 \times g/10$ min to remove unbroken cells, followed by a $20,000 \times g/10$ min centrifugation step to recover total membranes. The sample was stored at -70°C until use.

The colorless alga *Polytomella* sp. (198.80 Culture Collection of Algae, University of Göttingen, Germany, identical to *Polytomella parva*) was grown in liquid mineral Tris-acetate-phosphate medium (TAP 30 mM acetate) pH 7.0 [21] supplemented with a mix of vitamins (biotin $10^{-7}\%$, B12 vitamin $10^{-7}\%$, and B1 vitamin $2 \times 10^{-5}\%$ (w/v)). The culture was fed with a continuous air injection of 50 $\mu\text{L/s}$. No mechanical agitation was used. Cells were collected at the middle of the logarithmic phase by a 10-min centrifugation step at $7000 \times g$ and stored at -70°C until use. All the following steps were performed at 4°C . The cellular pellet was resuspended in SPT Buffer (0.3 M sucrose, 4 mM potassium EDTA, and 20 mM Tris, pH 7.2), and cells were broken mechanically with a Potter homogenizer with five to six gentle manual strokes of the Teflon pestle as described in [22]. Total membranes were obtained by differential centrifugation, $1000 \times g/10$ min to remove unbroken cells, followed by a $17,000 \times g/10$ min centrifugation step to recover total membranes. Samples were stored at -70°C until use.

Euglena gracilis (SAG 1224-5/25) was obtained from the University of Göttingen (Sammlung von Algenkulturen, Germany). Cells were grown in continuous light conditions, illuminated with a 4000-K white LED lamp at an intensity of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm). TMP medium supplemented with a vitamin mix was fed with a continuous CO_2 injection of 5.6 $\mu\text{L/s}$. Cells were collected at the middle of the logarithmic phase by a 10-min centrifugation step at $7000 \times g$ and stored at -70°C until use. All the following steps were performed at 4°C . Cells were washed with SHE buffer (sucrose 250 mM, HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.3) and disrupted with glass beads (500- μm diameter) using five 15-s vortex cycles with a 1-min rest. The sample was centrifuged ($2000 \times g/10$ min) to remove unbroken cells and total membranes were collected by centrifugation ($8500 \times g/10$ min) and stored at -70°C until use.

Phaeodactylum tricornerutum Pt1 8.6 (CCMP 2561) cells were grown in continuous light conditions, illuminated with a 4000-K white LED lamp at an intensity of 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm). Liquid ESAW medium [23] containing NaNO_3 (46.8 mg L^{-1}) and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.1 mg L^{-1}) was supplemented with the same mix of vitamins described above. The culture was fed with continuous air injection (40 $\mu\text{L/s}$). The cells were collected at the middle of the logarithmic phase by a 30-min centrifugation step at $7000 \times g$ and stored at -70°C until use. All following steps were performed at 4°C .

Cells were resuspended in SoHE buffer (0.66 M Sorbitol, 6 mM EDTA, 50 mM HEPES, 5 mM MnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7.3) in a 1:5 cells:buffer ratio (vol/vol). The suspension was mechanically broken with glass beads (500- μm diameter) by vortexing three times for 5 min, with 5-min resting on ice between each period. The sample was centrifuged ($2500 \times g/10$ min) to remove unbroken cells and total membranes were collected by centrifugation ($14,000 \times g/10$ min) and stored at -70 °C until use.

Growth Curves

Culture development was followed by two independent methods: chlorophyll *a* absorption was measured at 675 nm [24] on a VE-51000 UV Spectrometer (VELAB), and cell count was performed in a Neubauer double ruled Counting Chamber. Cell images were acquired with a Canon EOS 700D camera coupled to a CH2 modular biological microscope (Olympus). Dissolved O_2 was measured with a D09100 Oxygen Electrode (RCYAGO). Volumetric oxygen mass transfer coefficient (*kLa*) was determined as previously described in [25].

Native and Denaturing Electrophoresis

Total membranes were solubilized with *n*-dodecyl- β -D-maltoside (β -DDM) 2% in solubilization buffer (SB) containing 50 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgSO_4 , 100 mM NaCl, and 10% glycerol, pH 8.4. All steps were performed at 4 °C. The mixture was incubated with gentle agitation for 2 h, and centrifuged at $30,000 \times g$ for 30 min. After discarding the insoluble material, supernatants were subjected to BN-PAGE [26]. Native-PAGE was carried out in 4–12% acrylamide gradient gels. In gel activity for complex I was carried out as described by [27]. Protein concentration was determined by the Bradford method (Biorad).

Spectrometry Analysis

Spectra at room temperature were obtained directly from the collected cultured cells. Absorbance spectra were acquired on a Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer (Agilent), while fluorescence spectra (excitation $\lambda = 470$ nm) were obtained using a USB2000 + Ocean Optics Spectrometer coupled to a LS-450 Series Blue LED Pulsed Light Source (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA).

Paramylon Quantification

Total paramylon production was determined as described in [28] with slight modifications. Briefly, 8×10^6 cells from the stationary phase of the culture were collected by centrifugation at $2200 \times g/20$ min, and the cellular pellet was resuspended by vortex in 1.0 mL of SDS 1% and incubated 15 min in boiling water; after this period, the sample was incubated 10 min in ice and the paramylon pellet was collected by centrifugation at $2200 \times g/20$ min. This procedure was repeated one time, and an additional SDS 1% wash was performed. The clean paramylon pellet was resuspended by vortex in 1.0 mL of NaOH 1.0 M, and a sample of 50 μL was transferred to a new tube where 600 μL of phenol 5% solution was added followed by 2.5 mL of concentrated H_2SO_4 . The sample was incubated 25 min at 25 °C and the absorbance at 490 nm was determined. The concentration was estimated with a calibration curve (0–100 μg) of dextrose (USP standard).

Results

Antares I Allows Growth of Several Photosynthetic and Non-photosynthetic Eukaryotes

A diagram of the designed system is shown in Fig. 1; its modular architecture allows us to grow different culture volumes, from 0.5 to 7.5 L with light modulations from 10 to 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm) on white light and 10 to 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on a specific color: blue (455–465 nm), green (515–525 nm), red (635–645 nm), and far-red (720–730 nm) (Fig. 1, panel C). The principal culture parameters determined for all the species are presented in Table 1. The maximal cell density varies among the cultivated species, being approximately 3.2×10^6 , 0.78×10^6 , 0.4×10^6 , and 5.2×10^6 cells mL^{-1} for *C. reinhardtii*, *P. parva*, *E. gracilis*, and *P. tricornutum*, respectively (Fig. 2). An example of the increase of cellular density against time of a culture of *E. gracilis* is shown in Supplemental Fig. 2. The cells from the different organisms showed physical properties characteristic for each species (Fig. 3), e.g., mobility was observed for all species, except the diatom. To follow the culture development of photosynthetic species, the same samples used for cell counting were used to follow chlorophyll *a* absorption (675 nm). Similar growth curves to those described in Fig. 2 were obtained (Fig. S3, panels A–C). A nonlinear correlation of both growth curves was obtained for each species, indicating a proportional relation between the number of cells and the absorption of chlorophyll *a* (Fig. S3, panels D–I).

To evaluate the efficiency of the system on the distribution of the injected gases, the volumetric oxygen mass transfer coefficient (*kLa*) was determined. A value of 21.89 h^{-1} at an air flux of $50 \mu\text{L/s}$ was obtained (Fig. S4). The effect of this gas distribution was evaluated by growing *P. parva* under fully respiratory conditions (e.g., acetate as carbon source with different air fluxes) and *E. gracilis* grown phototrophically using different CO_2 fluxes. A direct effect of the air flux over the maximal cellular density was observed on *Polytomella* cultures (Fig. S5A and Table 1), interestingly, similar oxygen consumption curves were obtained under the three conditions (Fig. S5B). In a similar way, a larger amount of CO_2 flux increased the maximal cellular density up to 0.82×10^6 cells mL^{-1} of phototrophic *Euglena* cultures; although a decrease of the time to reach the stationary phase was also observed (Fig. S5C and Table 1), the oxygen concentration among all the *Euglena* growth curves remained between 92 and 99% (Fig. S5D) reflecting the oxygen production by the photosynthetic machinery. In summary, the PBR allows us to grow microorganisms with different physical and biological properties and to estimate the cell density measuring chlorophyll *a* absorption.

The Cultured Organisms Show Integrity of Their Bioenergetic Machinery

To evaluate the integrity of the bioenergetic machinery of each microalga, total membranes were prepared. The energy-transducing complexes, i.e., OXPHOS and photosynthetic complexes, were extracted from membranes with mild detergents, e.g., *n*-dodecyl- β -D-maltoside (β -DDM), and then subjected to BN-PAGE (Fig. 4). The presence of pigment-proteins complexes was directly observed in all species, except for *P. parva* (Fig. 4A). A difference in size between the photosynthetic complexes was evident, and probably related to different photosystem types or to the stability and structural differences between species. The presence of mitochondrial complex I was revealed with in-gel NADH:NBT

Table 1 Culture parameters from several microalga species growth in the designed PBR and flask system under similar culture conditions

Organism (condition)	Determines in the presented system			Literature values			References
	Doubling time (days)	Growth rate (days ⁻¹)	Maximum cell density (cells/mL)	Doubling time (days)	Growth rate (days ⁻¹)	Maximum cell density (cells/mL)	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (white 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , air 20 μL/s)	1.30	0.43	3.2 × 10 ⁶	0.58 150 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ 2.1–2.2 60 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ , 0.005% CO ₂	—	3.1 × 10 ⁷ CO ₂ enriched air, 200 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	[29–31]
<i>Polytomella parva</i> (TAP medium, air 50 μL/s)	0.96	0.68	0.78 × 10 ⁶	—	—	0.18 × 10 ⁶ TAP medium	[32]
<i>Polytomella parva</i> (TAP medium, air 37 μL/s)	1.15	0.60	0.41 × 10 ⁶	—	—	—	—
<i>Polytomella parva</i> (TAP medium, air 25 μL/s)	2.41	0.51	0.28 × 10 ⁶	—	—	—	—
<i>Euglena gracilis</i> (white 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ CO ₂ 5.6 μL/s)	2.23	0.31	0.4 × 10 ⁶	—	0.30 NI μmol photons m ⁻² s ⁻¹ 1.09 16 h/8 h (light/dark) intensity of 145 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	0.18 × 10 ⁶ 12 h/12 h (light/dark) 1-month culture 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹	[33–35]
<i>Euglena gracilis</i> (far-red 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ CO ₂ 5.6 μL/s)	2.76	0.25	0.4 × 10 ⁶	—	—	—	—
<i>Euglena gracilis</i> (white 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ CO ₂ 10.2 μL/s)	2.07	0.33	0.82 × 10 ⁶	—	—	—	—
<i>Euglena gracilis</i> (far-red 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ CO ₂ 10.2 μL/s)	1.99	0.32	0.79 × 10 ⁶	—	—	—	—

Table 1 (continued)

Organism (condition)	Determines in the presented system		Literature values		References
	Doubling time (days)	Growth rate (days ⁻¹)	Maximum cell density (cells/mL)	Maximum cell density (cells/mL)	
<i>Phaeodactylum tricoratum</i> (white 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ air 40 μL/s)	1.8	0.17	5.2 × 10 ⁶	0.75	[36, 37]
				1–2% CO ₂ 20-W fluorescent lamp 1.00 40 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ 16 °C pH 8.5	
<i>Phaeodactylum tricoratum</i> (green 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ air 40 μL/s)	1.13	0.62	14.9 × 10 ⁶	—	—
				0.5–0.7 1–2% CO ₂ 20-W fluorescent lamp 0.99 40 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ 16 °C pH 8.5	

NI, not indicated

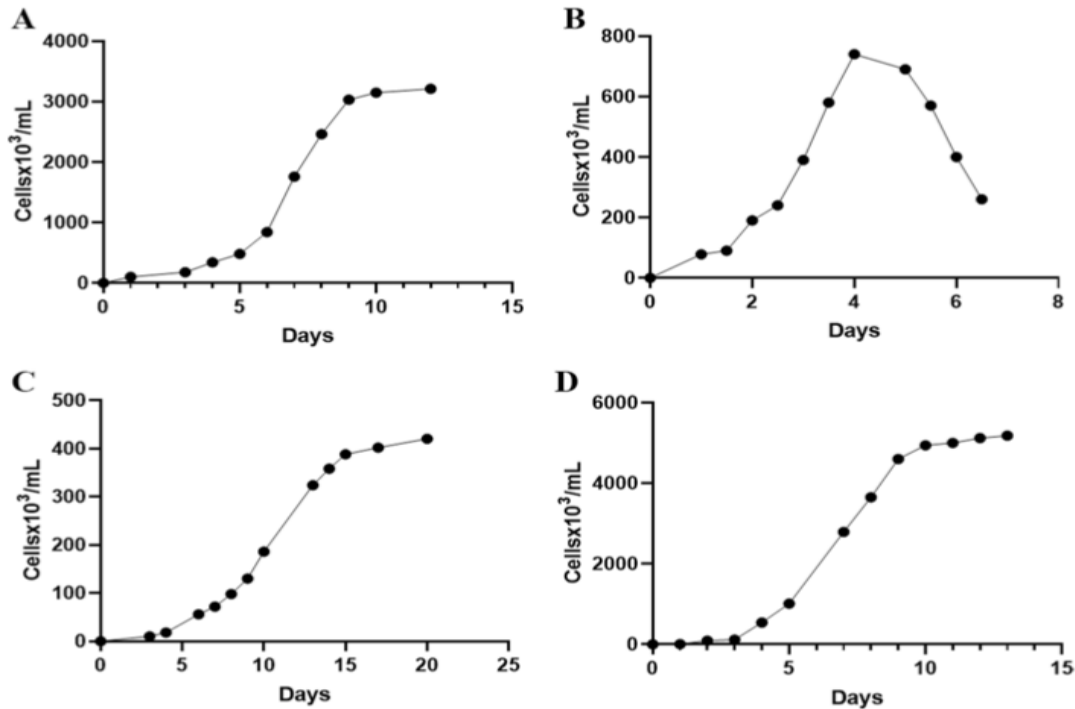


Fig. 2 Growth curves of 4 microalgal species in the modular photobioreactor Antares I. *Chlamydomonas reinhardtii* in TMP medium plus air injection of 20 $\mu\text{L/s}$ with 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm) (A), *Polytomella parva* in TAP medium plus air injection of 50 $\mu\text{L/s}$ (B), *Euglena gracilis* in TMP medium plus 5.6 $\mu\text{L/s}$ CO_2 injection with 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm) (C), and *Phaeodactylum tricornutum* in ESAW medium plus air injection of 40 $\mu\text{L/s}$ with 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (400–700 nm) (D)

dehydrogenase activity (Fig. 4B). The size of mitochondrial complex I also varied among the different species, as has been previously described [38–40]. The presence of both photosynthetic and mitochondrial complexes suggests that the integrity of the bioenergetic machineries is not compromised in the culture conditions used.

The Featured System Allows the Evaluation of Incoming Light Spectra on Cellular Development

To explore how our system allows to follow the effect of different light spectra on cellular development, *P. tricornutum* and *E. gracilis* were grown maintaining the same total photon concentration (100 and 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively), but using green light (515–525 nm, Fig. 5A) and far-red light (720–730 nm, Fig. 6A), respectively. A remarkable difference in the growth curves was observed for *P. tricornutum*, green light increased the maximal cellular level as compared to white light (Fig. 5B). To search for changes in pigment properties, absorption and fluorescence spectra were obtained. Slight changes were observed in absorption spectra, where a small increase in the 520–600- and 700–710-nm regions is detectable, and an additional 630-nm peak is present in green light-grown cells (Fig. 5C). Therefore, a small increase in red emission ($>700 \text{ nm}$) is observed for the green light culture; nevertheless, the same signal maxima are present for both conditions (Fig. 5D). *E. gracilis* was capable to grow using a far-red light as the primary source.

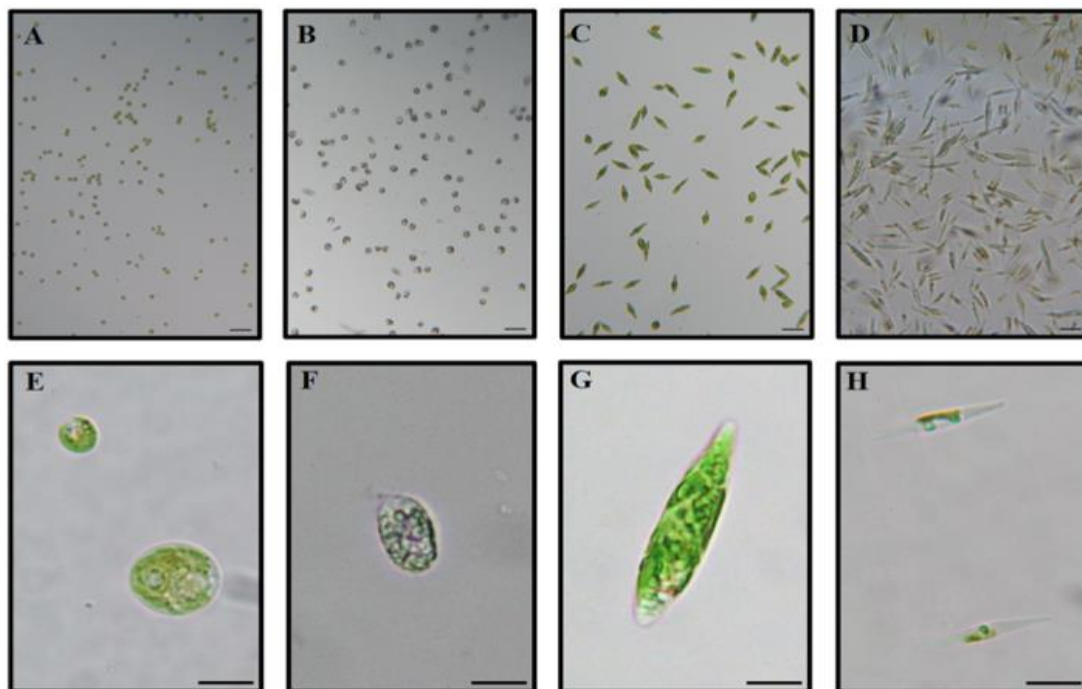


Fig. 3 Cellular morphology of grown microalgal species. Field view (upper panels) and zoomed view of cells (lower panels) in the middle of logarithmic phase, *Chlamydomonas reinhardtii* (A, E), *Polytomella parva* (B, F), *Euglena gracilis* (C, G), and *Phaeodactylum tricornerutum* (D, H). The scale bar is 10 μm

Similar growth curves were determined as compared to white light (Fig. 6B). An absorption increase in the 550–650-nm region can be observed (Fig. 6C). Interestingly, using a different spectra of incident light, a remarkable ~ 10 -nm shift in the fluorescence maximal emission was observed when comparing both cultures (Fig. 6D). To search for changes in storage polysaccharide production, total paramylon (β -1,3-glucan) content was determined for steady-state cells grown using both lights. Cells adapted to far-red light presented larger paramylon rate production compared with white light cultures (Fig. 6E).

Taken together, our results indicate that the described system is useful for the culture of different photosynthetic and non-photosynthetic eukaryotes under optimal conditions. It also allows the manipulation of incident light spectra. As shown in Figs. 5 and 6, this is an important parameter that modulates cell development that induces several metabolic changes, setting the point for further bioenergetics and photosynthesis research in these organisms.

Discussion

Culture conditions must be controlled to assure the reproducibility of a given metabolic state or metabolite production in microalgal biotechnology. The determined microalga growth curves have similar shapes as those of other organisms such as bacteria [41] and yeast [42]; however, the time to reach the stationary state varies widely among the studied species, from 4 days in *Polytomella* to up to 15–20 days in *Euglena* (Fig. 2). This fact emphasizes the

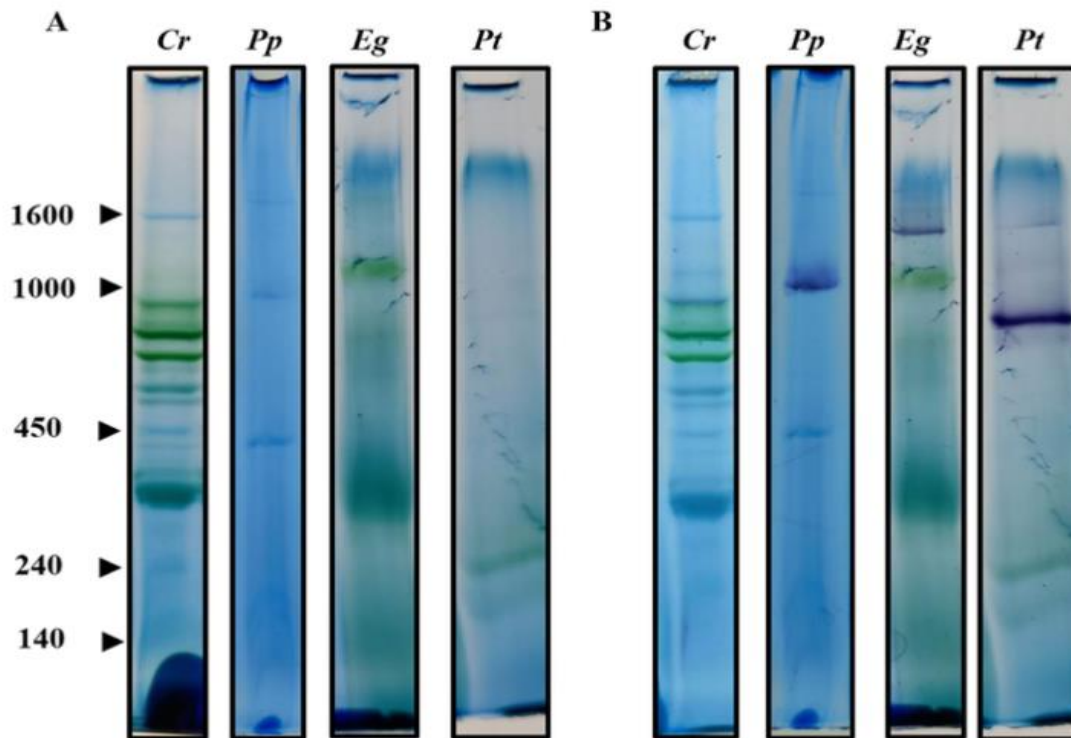


Fig. 4 Bioenergetic complexes from the studied microalgal species. Total membranes (0.4 μg) were solubilized with *n*-dodecyl- β -D-maltoside (DDM) (2%) and resolved by BN-PAGE in a 4–12% polyacrylamide gradient gel (A). In-gel NADH-dehydrogenase activity; the BN-gel was incubated in the presence of NADH and nitro blue tetrazolium chloride (NBT) to evidence the presence of mitochondrial complex I (B). *Cr*, *Pp*, *Eg*, and *Pt* correspond to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Polytomella parva*, *Euglena gracilis*, and *Phaeodactylum tricornutum*, respectively. Molecular masses in kDa are marked on the left side

importance to have a quick way to estimate cell density in the growing cultures, especially in the absence of high-cost cell counters. Chlorophyll *a* is a widely distributed pigment present in the majority of photosynthetic organisms and its absorption is usually proportional to cell number in many phytoplankton species [24]. Here, we determined a correlation between chlorophyll *a* absorption and cell density for each of the studied photosynthetic species (Fig. S3); thus, a quick absorbance determination at 675 nm allows us to estimate cell numbers with confidence for each species. The determined doubling time for *Chlamydomonas* culture (1.3 days) is half of the previously reported for flask culture using similar media and light conditions [29]. On the other hand, *Polytomella* reached a maximum cell density of 7.8×10^5 cells/mL, which is larger than the 1.8×10^5 cells/mL value previously reported for wide-bottom flask culture [32] (Table 1); to our knowledge, this is the first report of a *Polytomella* culture in a non-flask related system.

The volumetric oxygen mass transfer coefficient (*kLa*) is an important parameter in the PBRs that reflects an adequate gas distribution to optimize the conditions for proliferation of cells. The determined *kLa* value is comparable with those of other systems suitable for microalgal culture [43, 44] reflecting a good gas distribution. In fully aerobic *Polytomella* cultures, the oxygen injection, but not its distribution, seems to be the limiting factor; this is observed in the similar shape of the oxygen consumption among the three evaluated conditions (Fig. S5A, lower panel), and evidence the importance of the *kLa* as a crucial step

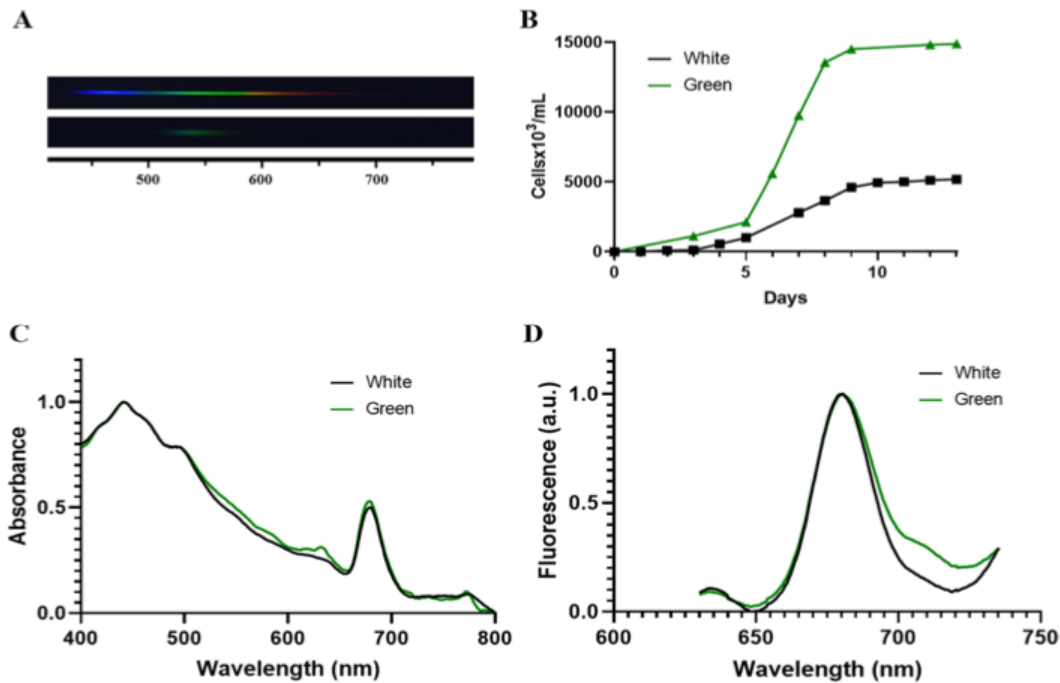


Fig. 5 Effect of different light spectra on *Phaeodactylum tricornutum* growth. **A** Graphic frame of the spectra used for both culture conditions, white light (upper panel) and green light (lower panel). **B** Growth curves of *P. tricornutum* under different light sources: black line, white light; green line, green light (515–525 nm). **C** Room temperature absorption spectra of *P. tricornutum* cell growth under different light sources: black line, white light; green line, green light (515–525 nm). **D** Room temperature fluorescence spectra (excitation $\lambda=470$ nm) of *P. tricornutum* cell growth under different light sources: black line, white light; green line, green light (515–525 nm)

in the design, operation, and scaleup of bioreactors [45]. In the case of phototrophically growth *Euglena*, the increase of CO_2 derived into an larger cell density of the culture which is in line with the large capacity of CO_2 fixation in different microalga species [46].

Cell bioenergetic machineries are the main energy producers in microalgae: OXPHOS in mitochondria and photosynthesis in chloroplasts. Although the two processes can be studied apart, in vivo they both cooperate and self-regulate, e.g., OXPHOS provides the ATP for carbon fixation when the photosynthetic machinery is compromised in *Chlamydomonas* [47, 48]. Cooperation between mitochondria and chloroplasts has also been observed in *Euglena* [49] and *Phaeodactylum* [50] species. The fact that our cultivated organisms exhibited typical morphologies (Fig. 3) and the presence of photosynthetic and mitochondrial complexes (Fig. 4) indicates that, under the standardized conditions, our system is useful to routinely grow photosynthetic and non-photosynthetic eukaryotes.

Light spectra vary naturally with time and localization during each day [51]. In some places, depending on the latitude, this variation is even larger during the progress of the year, and can be further affected by atmospheric factors [52]. Therefore, to assure survival, photosynthetic organisms have improved light harvesting to adapt to a large variety of niches. Beyond assuring life, this adaptation to light is also reflected in metabolic changes. For instance, exposure to spectra of variable composition affects the organoleptic characteristics of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) [53]. Also, blue light

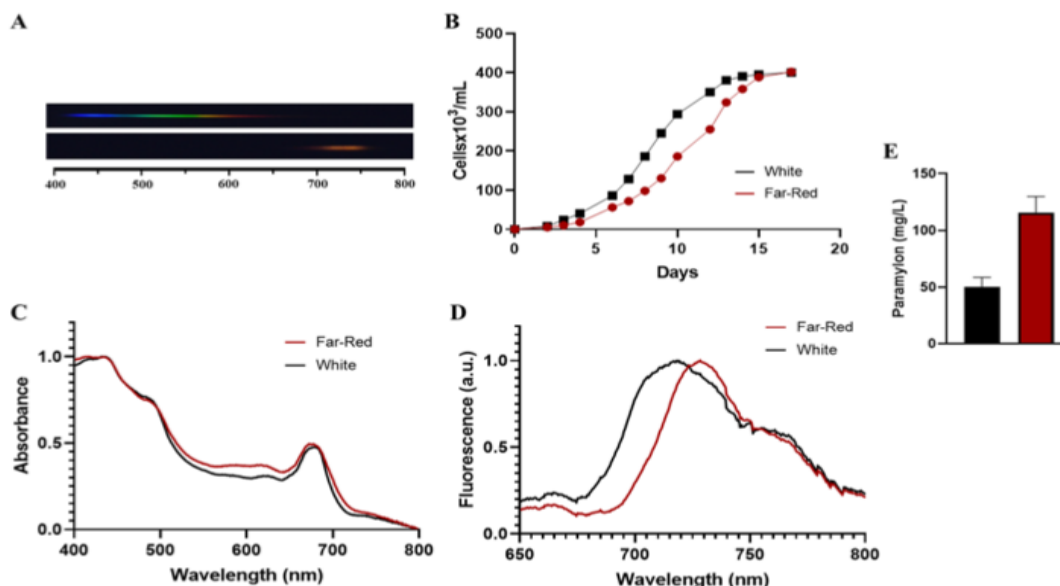


Fig. 6 Effect of different light spectra on *Euglena gracilis* growth. **A** Graphic frame of the spectra used for both culture conditions, white light (upper panel) and far-red light (lower panel). **B** Growth curves of *E. gracilis* under different light sources: black line, white light; red line, far-red light (720–730 nm). **C** Room temperature absorption spectra of *E. gracilis* cell growth under different light sources: black line, white light; red line, far-red light (720–730 nm). **D** Room temperature fluorescence spectra (excitation $\lambda=470$ nm) of *E. gracilis* cell growth under different light sources: black line, white light; red line, far-red light (720–730 nm). **E** Paramylon (β -(1,3)-glucan) determination from *E. gracilis* growth under different light regimes: black column, white light; red column, far-red light (720–730 nm).

showed effects on the production of carotenoids and other pigments in crops [54]. As in other better studied photosynthetic organisms, microalgal growth is affected by differences in light source like fluorescent lamps, RGB LEDs, or white LEDs [55, 56]. Additionally, irradiance and wavelength also affects production of metabolites like fatty acids, pigments, and carotenoids [57–59]. Consequences on growth can be observed in the *Phaeodactylum* species, where the maximal density is notably increased when this diatom was grown under green light (515–525 nm) (Fig. 5B). Previous reports proposed that silicon enhances growth under green light [60] but all our test were performed in silicon-free artificial medium. The spectroscopic analysis indicated only a small absorption increase in the 520–600-nm region and an extra peak at 630 nm (Fig. 5C), not accompanied by changes in the maximal fluorescence signal (Fig. 5D). These slight differences in absorption capacity may be related to a pigment content modification, especially because the chlorophyll *c/a* ratio increased from 0.54 to 0.68 between white and green light cultures. This is in agreement with previous reports, where no major spectroscopic differences were detected when this species was grown under different light wavelengths [61]. Globally, this indicates that the remarkable change in growth speed is related to a pigment content modifications and the ability of green photons to penetrate deeper into high-density cultures compared to other wavelengths [62] rather than to drastic structural changes in the photosynthetic machinery. While green light is usually less effectively utilized for growth because of the so-called green gap between 500 and

600 nm, the marine chlorophyte *Picochlorum* sp. is able to grow efficiently under green light reaching comparable biomass yields to red and white light controls [63].

The longest wavelength captured by antenna chlorophylls that can efficiently drive the reaction centers is ca. 680–700 nm, known as the “red limit” of oxygenic photosynthesis [64]. Interestingly, *Euglena gracilis* was able to grow under far-red light (720–730 nm) reaching a similar cellular density as under white light (Fig. 6B). Our spectroscopic analysis revealed no considerable differences between the absorption properties of both type of cells, e.g., white and far-red grown cells (Fig. 6C); nevertheless, a remarkable ~10-nm red shift in the fluorescence maximum signal appeared (Fig. 6D). A similar spectroscopic red shift has been observed in the cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* grown under far-red light that has been related to a change in the chlorophyll *a*/*f* ratio in the far-red absorbing antenna [65] that increases both absorption and quantum efficiency of Photosystem II [66]. A recent model proposes an adaptation of chlorophyll *a* in eukaryotic reaction centers, rather than an exchange of pigments; along this line, the reaction center is preorganized for charge separation in the far-red region by specific chlorophyll–pheophytin pairs [67]. Nevertheless, the specific far-red light adaptive mechanism of the *Euglena* photosynthetic machinery remains obscure, and for sure leaves the door open for further research in the peculiarities of its light-induced adaptation. The metabolic effect of light spectra was also observed in the production of paramylon, the storage carbohydrate in this species, where the far-red light induced a larger paramylon production (Fig. 6E), a similar, but less remarkable effect on this carbohydrate production that has been observed in *Euglena* grown under red light [68]; nevertheless, to our knowledge, this is the first report of the effect of larger wavelength (720–730 nm) on β -1,3-glucan production in *E. gracilis*.

Concluding Remarks

The discovery of new microalgal species and the development of new molecular techniques to modify them may lead to new strategies to confront the actual climate crisis. For this purpose, several culture conditions need to be tested in a fast and reliable way. Our featured system fulfils this task and is especially designed to control and manipulate the main variables of microalgal culture, particularly allowing a flexible modulation of light incident spectra, and aims to implement downstream bioenergetic and photosynthesis research. The total cost of the system is about 3000 US dollars (Table S1); nevertheless, we have to note that the larger cost is related to the temperature module, where the water chiller represents more than one-third of the total cost of the system. The present work may represent a guide to build a photobioreactor with the versatility to exchange the components depending on the availability and price of the small commercial devices. Unfortunately, most commercially available systems leave the spectral modulation outside their scope, but our affordable system gives the opportunity to expand the tools available for bioenergetic and photosynthesis research to a larger scientific community.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04629-0>.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Ivan de Jesus Salgado Ramos (IPN, Mexico), Dr. Diego González Halphen (UNAM, Mexico), Dr. Ruy Pérez Montfort (UNAM, Mexico), and Dr. Pierre Cardol (ULg, Belgium) for their critical review of the original manuscript. The technical support of biotechnological specialist Marco Antonio Ortiz Jiménez is also acknowledged.

Author Contribution Mónica Rodríguez-Bolaños and Héctor V. Miranda-Astudillo conceived the research; Mónica Rodríguez-Bolaños, Gloria Vargas-Romero, Girian Jaguer-García, Zhaida I. Aguilar-Gonzalez, and Verónica Lagos-Romero performed the experiments; Mónica Rodríguez-Bolaños, Gloria Vargas-Romero, Girian Jaguer-García, Zhaida I. Aguilar-Gonzalez, and Héctor V. Miranda-Astudillo analyzed the data; Héctor V. Miranda-Astudillo wrote the manuscript. All the authors reviewed the manuscript.

Funding This work was supported by grant UNAM-PAPIIT IA204122 and by the Institutional Program (IIBO-UNAM) “The production of biomolecules of biomedical interest in microorganisms.”

Data Availability Not applicable

Declarations

Ethics Approval Not applicable

Consent to Participate Not applicable

Consent to Publish Not applicable

Competing Interests The authors declare the following competing interests: the described system is under patent application: Universidad Nacional Autónoma de México, application number MX/a/2023/002617.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Reid, P. C., Fischer, A. C., Lewis-Brown, E., Meredith, M. P., Sparrow, M., Andersson, A. J., ... Washington, R. (2010). Impacts of the oceans on climate change. *Advances in Marine Biology*, 56(09), 1–150. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(09\)56001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(09)56001-4)
2. Sharma, M., Thukral, N., Soni, N. K., & Maji, S. (2015). Microalgae as future fuel: real opportunities and challenges. *Journal of Thermodynamics and Catalysis*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2157-7544.1000139>
3. Schirrmeister, B. E., Gugger, M., & Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: Evidence from genes and fossils. *Palaeontology*, 58(5), 769–785. <https://doi.org/10.1111/pala.12178>
4. Chapman, R. L. (2013). Algae: The world’s most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9>
5. Reyes-Prieto, A., & Bhattacharya, D. (2007). Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Molecular Biology and Evolution*, 24(11), 2358–2361. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm186>
6. Atteia, A., Van Lis, R., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2013). Anaerobic energy metabolism in unicellular photosynthetic eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(2), 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.08.002>
7. Cheng, J., Huang, Y., Feng, J., Sun, J., Zhou, J., & Cen, K. (2013). Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. *Bioresour. Technol.*, 144, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.122>
8. Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Ho, S. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based biorefinery - from biofuels to natural products. *Bioresour. Technol.*, 135, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>

9. de Morais, M. G., de Morais, E. G., Duarte, J. H., Deamici, K. M., Mitchell, B. G., & Costa, J. A. V. (2019). Biological CO₂ mitigation by microalgae: Technological trends, future prospects and challenges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(5), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2650-9>
10. Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, *4*(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>
11. Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2013). *Design of photobioreactors for algal cultivation. Biofuels from Algae*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00002-4>
12. Daneshvar, E., Sik, Y., Tavakoli, S., Sarkar, B., & Shaheen, S. M. (2021). Bioresource Technology Insights into upstream processing of microalgae : a review, *329*(January). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>
13. Barati, B., Zeng, K., Baeyens, J., Wang, S., Addy, M., Gan, S. Y., & El-Fatah Abomohra, A. (2021). Recent progress in genetically modified microalgae for enhanced carbon dioxide sequestration. *Biomass and Bioenergy*, *145*(December 2020), 105927. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105927>
14. Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y., & Matsunaga, T. (1997). Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology and Bioengineering*, *53*(2), 185–190. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970120\)53:2%3c185::AID-BIT8%3e3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2%3c185::AID-BIT8%3e3.0.CO;2-K)
15. Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., ... Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*, *229*, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
16. Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, *25*(3), 743–756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
17. Silva, S. C., Ferreira, I. C. F. R., Dias, M. M., & Filomena Barreiro, M. (2020). Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules*, *25*(15), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules25153406>
18. Abid, H. A., Ong, J. W., Lin, E. S., Liew, O. W., & Ng, T. W. (2020). Volume and rate measurement of slowly generated gas bubbles. *Flow Measurement and Instrumentation*, *72*(December 2019), 101694. <https://doi.org/10.1016/j.flowmeasinst.2020.101694>
19. Harris, E. H., Stern, D. B., & Witman, G. B. (2009). *Chlamydomonas* in the laboratory. In E. H. Harris, D. B. Stern, & G. B. Witman (Eds.), *The Chlamydomonas sourcebook* (pp. 241–302). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00008-3>
20. Remacle, C., Baurain, D., Cardol, P., & Matagne, R. F. (2001). Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics*, *158*(3), 1051–1060. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.3.1051>
21. Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *54*(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>
22. Vázquez-Acevedo, M., Cardol, P., Cano-Estrada, A., Lapaille, M., Remacle, C., & González-Halphen, D. (2006). The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *38*(5–6), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9046-x>
23. Berges, J. A., Franklin, D. J., & Harrison, P. J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades. *Journal of Phycology*, *37*(6), 1138–1145. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x>
24. Kenworthy, W. J., Gallegos, C. L., Costello, C., Field, D., & di Carlo, G. (2014). Dependence of eelgrass (*Zostera marina*) light requirements on sediment organic matter in Massachusetts coastal bays: Implications for remediation and restoration. *Marine Pollution Bulletin*, *83*(2), 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.11.006>
25. Zhu, L., Xu, B., Wu, X., Lei, J., Hacker, D. L., Liang, X., & Wurm, F. M. (2020). Analysis of volumetric mass transfer coefficient (k_L a) in small- (250 mL) to large-scale (2500 L) orbitally shaken bioreactors. *3 Biotech*, *10*(9), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02352-9>
26. Schägger, H. (1994). Native gel electrophoresis. In G. von Jagow & H. Schägger (Eds.), *A practical guide to membrane protein purification* (pp. 81–104). Academic Press.
27. Miranda-Astudillo, H., Colina-Tenorio, L., Jiménez-Suárez, A., Vázquez-Acevedo, M., Salin, B., Giraud, M.-F., ... González-Halphen, D. (2018). Oxidative phosphorylation supercomplexes and

- respirasome reconstitution of the colorless alga *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(6), 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.03.004>
28. Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Mendoza-Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2160–2172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04848.x>
 29. Vance, P., & Spalding, M. H. (2005). Growth, photosynthesis, and gene expression in *Chlamydomonas* over a range of CO₂ concentrations and CO₂/O₂ ratios: CO₂ regulates multiple acclimation states. *Canadian Journal of Botany*, 83(7), 796–809. <https://doi.org/10.1139/b05-064>
 30. Melero-Jiménez, I. J., Bañares-España, E., García-Sánchez, M. J., & Flores-Moya, A. (2022). Changes in the growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* under long-term selection by temperature and salinity: acclimation vs. evolution. *Science of the Total Environment*, 822. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153467>
 31. Freudenberg, R. A., Baier, T., Einhaus, A., Wobbe, L., & Kruse, O. (2021). High cell density cultivation enables efficient and sustainable recombinant polyamine production in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology*, 323(November 2020), 124542. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124542>
 32. Atteia, A., Van Lis, R., Ramírez, J., & González-Halphen, D. (2000). *Polytomella* spp. growth on ethananol. Extracellular pH affects the accumulation of mitochondrial cytochrome c550. *European Journal of Biochemistry*, 267(10), 2850–2858. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01288.x>
 33. Kato, S., & Nam, H. G. (2021). The cell division cycle of *euglena gracilis* indicates that the level of circadian plasticity to the external light regime changes in prolonged-stationary cultures. *Plants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071475>
 34. Campden, J., Dhillon, H., Mahil, T., & Qu, T. (2022). *Euglena gracilis* growth rate under different light exposure length and the underlying relationship. *Expedition Journal*, 13. Retrieved from <https://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/article/view/197322> on Feb 9th, 2023
 35. Olaveson, M. M., & Nalewajko, C. (2000). Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species. *Hydrobiologia*, 433(1), 39–56. <https://doi.org/10.1023/A:1004006401516>
 36. Mann, J., & Myers, J. (1968). On pigments, growth, and photosynthesis of *Phaeodactylum tricoratum*. *Journal of Phycology*, 4, 349–355.
 37. Torres, M. A., Ritchie, R. J., Lilley, R. M. C., Grillet, C., & Larkum, A. W. D. (2014). Measurement of photosynthesis and photosynthetic efficiency in two diatoms. *New Zealand Journal of Botany*, 52(1), 6–27. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.831917>
 38. Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R. F., & Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1658(3), 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.06.001>
 39. Miranda-Astudillo, H., Yadav, K. N. S., Colina-Tenorio, L., Bouillenne, F., Degand, H., Mossomme, P., ... Cardol, P. (2018). The atypical subunit composition of respiratory complexes I and IV is associated with original extra structural domains in *Euglena gracilis*. *Scientific reports*, 8(1), 9698. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28039-z>
 40. van Lis, R., González-Halphen, D., & Atteia, A. (2005). Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1708(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.12.010>
 41. Macedo-Márquez, A., Vázquez-Acevedo, M., Ongay-Larios, L., Miranda-Astudillo, H., Hernández-Muñoz, R., González-Halphen, D., ... Ramoni, R. (2014). Overexpression of a monomeric form of the bovine odorant-binding protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress. *Free Radical Research*, 48(7), 814–822. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.910867>
 42. Cruz-Torres, V., Vázquez-Acevedo, M., García-Villegas, R., Pérez-Martínez, X., Mendoza-Hernández, G., & González-Halphen, D. (2012). The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(12), 2128–2139. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.006>
 43. Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M. C., Domínguez-Bocanegra, A. R., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2005). *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 31–35. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1863-4>

44. Pham, H. M., Kwak, H. S., Hong, M. E., Lee, J., Chang, W. S., & Sim, S. J. (2017). Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 239, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.030>
45. Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, 27(2), 153–176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
46. Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
47. Cardol, P., Alric, J., Girard-Bascou, J., Franck, F., Wollman, F.-A., & Finazzi, G. (2009). Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15979–15984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908111106>
48. Dang, K.-V., Plet, J., Tolleter, D., Jokel, M., Cuiné, S., Carrier, P., ... Peltier, G. (2014). Combined increases in mitochondrial cooperation and oxygen photoreduction compensate for deficiency in cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 26(7), 3036–3050. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126375>
49. Gain, G., Vega de Luna, F., Cordoba, J., Perez, E., Degand, H., Morsomme, P., ... Cardol, P. (2021). Trophic state alters the mechanism whereby energetic coupling between photosynthesis and respiration occurs in *Euglena gracilis*. *New Phytologist*, 232(4), 1603–1617. <https://doi.org/10.1111/nph.17677>
50. Bailleur, B., Berne, N., Murik, O., Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., ... Finazzi, G. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature*, 524(7565), 366–369. <https://doi.org/10.1038/nature14599>
51. Judd, D. B., MacAdam, D. L., Wyszecski, G., Budde, H. W., Condit, H. R., Henderson, S. T., & Simonds, J. L. (1964). Spectral distribution of typical daylight as a function of correlated color temperature. *Journal of the Optical Society of America*, 54(8), 1031. <https://doi.org/10.1364/josa.54.001031>
52. Kotilainen, T., Aphalo, P. J., Brelford, C. C., Böök, H., Devraj, S., Heikkilä, A., ... Robson, T. M. (2020). Patterns in the spectral composition of sunlight and biologically meaningful spectral photon ratios as affected by atmospheric factors. *Agricultural and Forest Meteorology*, 291(September 2019), 108041. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108041>
53. Gangadhar, B. H., Mishra, R. K., Pandian, G., & Park, S. W. (2012). Comparative study of color, pungency, and biochemical composition in chili pepper (*Capsicum annum*) under different light-emitting diode treatments. *HortScience*, 47(12), 1729–1735. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.12.1729>
54. Kopsell, D. A., Sams, C. E., & Morrow, R. C. (2015). Blue wavelengths from led lighting increase nutritionally important metabolites in specialty crops. *HortScience*, 50(9), 1285–1288. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.9.1285>
55. Wicker, R. J., Autio, H., Daneshvar, E., Sarkar, B., Bolan, N., Kumar, V., & Bhatnagar, A. (2022). The effects of light regime on carbon cycling, nutrient removal, biomass yield, and polyhydroxybutyrate (PHB) production by a constructed photosynthetic consortium. *Bioresource Technology*, 363(July), 127912. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127912>
56. Bialevich, V., Zachleder, V., & Bišová, K. (2022). The effect of variable light source and light intensity on the growth of three algal species. *Cells*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cells11081293>
57. Diaz-MacAdoo, D., Mata, M. T., & Riquelme, C. (2022). Influence of irradiance and wavelength on the antioxidant activity and carotenoids accumulation in *Muriellopsis* sp. isolated from the Antofagasta Coastal Desert. *Molecules*, 27(8), 2412. <https://doi.org/10.3390/molecules27082412>
58. Helamieh, M., Reich, M., Bory, S., Rohne, P., Riebesell, U., Kerner, M., & Kümmerer, K. (2022). Blue-green light is required for a maximized fatty acid unsaturation and pigment concentration in the microalga *Acutodesmus obliquus*. *Lipids*, 57(4–5), 221–232. <https://doi.org/10.1002/lipid.12343>
59. Bian, Z. H., Yang, Q. C., & Liu, W. K. (2015). Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(5), 869–877. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6789>
60. Zhao, P., Gu, W., Wu, S., Huang, A., He, L., Xie, X., ... Wang, G. (2014). Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricorneratum* Bohlin under green light and low temperature. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep03958>
61. Oka, K., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J. R., Nagao, R., & Akimoto, S. (2020). Adaptation of light-harvesting and energy-transfer processes of a diatom *Phaeodactylum tricorneratum* to different light qualities. *Photosynthesis Research*, 146(1–3), 227–234. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00714-1>
62. Ooms, M. D., Graham, P. J., Nguyen, B., Sargent, E. H., & Sinton, D. (2017). Light dilution via wavelength management for efficient high-density photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(6), 1160–1169. <https://doi.org/10.1002/bit.26261>

63. Paper, M., Glemser, M., Haack, M., Lorenzen, J., Mehlmer, N., Fuchs, T., ... Brück, T. B. (2022). Efficient green light acclimation of the green algae *Picochlorum* sp. triggering geranylgeranylated chlorophylls. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.885977>
64. Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & Govindjee. (2009). A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, *99*(2), 85–98. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>
65. Nürnberg, D. J., Morton, J., Santabarbara, S., Telfer, A., Joliot, P., Antonaru, L. A., ... William Rutherford, A. (2018). Photochemistry beyond the red limit in chlorophyll f-containing photosystems. *Science*, *360*(6394), 1210–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aar8313>
66. Mascoli, V., Bhatti, A. F., Bersanini, L., van Amerongen, H., & Croce, R. (2022). The antenna of far-red absorbing cyanobacteria increases both absorption and quantum efficiency of Photosystem II. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31099-5>
67. Sirohiwal, A., & Pantazis, D. A. (2022). The electronic origin of far-red-light-driven oxygenic photosynthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, *61*(16), 1–5. <https://doi.org/10.1002/anie.20220356>
68. Takahito, M., Hiroshi, I., Kazutaka, M., Yoshihisa, N., & Katsusuke, M. (2007). Effect of light quality and CO₂ concentration on protein, pramylon and fatty Acid contents in autotrophically cultured *Euglena gracilis*. *Eco-engineering*, *19*(4), 223–227. <https://doi.org/10.11450/seitaikogaku.19.223>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.