

De verde a marrón: Desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii* mediante expresión heteróloga

Ana Carleth Escobar-Ricárdez^{1,2}, Caleb Edmundo Rosales-Linares^{1,3}, Gabriela Aimee Salazar-Mata¹, Lorena Yamileth Balón-Rosas¹, Daniela Morales-Sánchez^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, 62700

²Tecnológico Nacional de México, campus Tuxtla Gutiérrez, Carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, 29050

³Universidad Politécnica del Estado de Morelos UPEMor, Boulevard Cuauhnáhuac 566, Jiutepec, Morelos, 62550

*daniela.morales@ibt.unam.mx

Resumen

Chlamydomonas reinhardtii es un organismo fotosintético versátil y seguro (GRAS), que emerge como una plataforma prometedora para la producción de metabolitos de alto valor biotecnológico. Este estudio demuestra la viabilidad de utilizar esta microalga como fábrica fotosintética para la producción de melanina. Mediante el sistema de biología sintética MoClo, se diseñó el vector MelAL2 portando el gen *melA* de *Rhizobium etli*, que codifica para una tirosinasa clave en la ruta de síntesis de melanina. La cepa *C. reinhardtii* UVM4 fue transformada exitosamente y las cepas seleccionadas mostraron una alta fluorescencia del reportero mRuby2 (hasta 120 RFU) confirmando la expresión del transgén. Cabe mencionar que, la integración estable del gen *melA* en el genoma de *C. reinhardtii* se validó por PCR. Asimismo, los cultivos transformados desarrollaron una pigmentación oscura distintiva, correlacionada con un aumento significativo en la absorbancia a 400 nm en el sobrenadante, confirmando cuantitativamente la producción de melanina en niveles muy superiores a los observados en las cepas control. Estos resultados constituyen una prueba pionera para la síntesis heteróloga de melanina en microalgas, estableciendo las bases para el desarrollo de plataformas de producción sostenible para pigmentos y otros metabolitos de interés biotecnológico.

Palabras Claves: Fotoprotección, tirosinasa, gen *melA*, microalga, MoClo

Abstract

Chlamydomonas reinhardtii is a versatile and safe photosynthetic organism (GRAS), emerging as a promising platform for the production of high-value biotechnological metabolites. This study demonstrates the feasibility of using this microalga as a photosynthetic factory for melanin production. Through the MoClo synthetic biology system, the MelAL2 vector was designed carrying the *melA* gene from *Rhizobium etli*, which encodes a key tyrosinase in the melanin synthesis pathway. The *C. reinhardtii* UVM4 strain was successfully transformed and the selected strains showed high mRuby2 reporter fluorescence (up to 120 RFU) confirming transgene expression. Notably, the stable integration of the *melA* gene into the *C. reinhardtii* genome was validated by PCR. Furthermore, the transformed cultures developed a distinctive dark pigmentation, correlated with a significant increase in absorbance at 400 nm in the supernatant, quantitatively confirming melanin production at levels far superior to those observed in control strains. These results constitute pioneering proof for the heterologous synthesis of melanin in microalgae, establishing the foundation for the development of sustainable production platforms for pigments and other metabolites of biotechnological interest.

Key Words: Photoprotection, tyrosinase, *melA* gene, microalgae, MoClo

Introducción

Las microalgas, un grupo diverso de microorganismos fotosintéticos presentes tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, incluyen algas eucariotas y procariotas (Maeda *et al.*, 1995). Las cianobacterias o algas verde-azules son ejemplos de procariotas (*Cyanophyceae*), mientras que las eucariotas, incluyen a las algas verdes (*Chlorophyta*), las diatomeas (*Bacillariophyta*), algas cafés (*Phaeophyceae*), algas rojas (*Rhodophyceae*), etc. (Mata *et al.*, 2010). Estos microorganismos no solo se destacan por su eficiencia en la fijación de CO₂ (superior a la de las plantas), sino también por su capacidad para convertir este gas en moléculas de alto valor biotecnológico, como ácidos grasos omega, proteínas, polisacáridos, probióticos, vitaminas y pigmentos antioxidantes (Morales-Sánchez *et al.*, 2017).

Su versatilidad metabólica permite que se puedan cultivar de tres maneras diferentes: 1. Cultivo fototrófico, utilizando ya sea luz solar o artificial y CO₂ en sistemas abiertos al ambiente tipo circuito y/o en sistemas cerrados como fotobiorreactores (Mata *et al.*, 2010), 2. Cultivo heterotrófico, utilizando una fuente de carbono orgánica en biorreactores (Morales-Sánchez *et al.*, 2015) y 3. Cultivo mixotrófico, con luz y fuente de carbono orgánica (Moon *et al.*, 2013, Urme *et al.*, 2025). Cabe destacar que los cultivos de microalgas pueden integrar múltiples objetivos dentro de un mismo proceso, como el tratamiento de aguas residuales, la obtención de biocombustibles, la producción de sustancias químicas finas, entre otros (Arredondo and Vázquez-Duhalt, 1991).

Asimismo, estos microorganismos se perfilan como una plataforma eficiente, segura y económica para la producción de proteínas heterólogas. Esta ventaja se sustenta en su condición de organismo GRAS (Generally Recognized as Safe), al no compartir patógenos con humanos, lo que garantiza un alto perfil de seguridad (Torres-Tiji *et al.*, 2020). A ello se suman sus cortos tiempos de duplicación (inferiores a 5 horas en algunas especies) y sus requerimientos nutricionales sencillos, basados principalmente en CO₂, lo que abarata notablemente su cultivo a gran escala (Metting Jr., 1996). Estas

características las hacen significativamente más viables en comparación con sistemas convencionales como el cultivo de células de mamíferos (Banerjee and Ward, 2022). Gracias a estas propiedades, las microalgas resultan altamente prometedoras para su uso como suplementos alimenticios, vehículos de administración de fármacos, posibles portadores de vacunas orales y sistemas sostenibles de producción de proteínas heterólogas (Khavari *et al.*, 2021).

***Chlamydomonas reinhardtii* como plataforma genética**

El alga verde unicelular *C. reinhardtii* es un organismo modelo consolidado en estudios de la fotosíntesis, la función flagelar, entre otros (Riekhof *et al.*, 2005; Merchant *et al.*, 2007). Su genoma está ampliamente caracterizado, con sus tres compartimentos (núcleo, cloroplasto y mitocondria) completamente secuenciados (Maul *et al.*, 2002; Popescu and Lee 2007; Merchant *et al.*, 2007) y cuenta con un robusto conjunto de herramientas moleculares y métodos de transformación genética bien establecidos (Harris *et al.*, 2009). Desde el punto de vista biotecnológico, *C. reinhardtii* presenta ventajas notables ya que crece relativamente rápido, duplicándose cada 5-8 horas con una capacidad de alcanzar altas densidades celulares (superiores a 10⁷ células/mL) y requerimientos de cultivo mínimos, lo que la hace económica y de manejo sencillo (Rasala and Mayfield, 2011). En ella se han expresado con éxito diversas proteínas de valor, como las hormonas de crecimiento humano, vacunas y otros biofármacos, tanto en el núcleo como en el cloroplasto (Tabla 1) (Wannathong *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2020). No obstante, el desarrollo de sistemas de expresión multigénica en esta microalga ha avanzado más lentamente que en otros huéspedes, como las células de tabaco (Guo *et al.*, 2017). A pesar de ello, los recientes avances en la producción de proteínas recombinantes sugieren que *C. reinhardtii* podría tener un papel clave en la producción de compuestos de interés para las industrias farmacéutica y nutracéutica (Masi *et al.*, 2023).

Una estrategia particularmente prometedora para superar estas limitaciones es la adopción de herramientas estandarizadas de biología sintética. Bajo el marco del ciclo Diseño-Construcción-Prueba-Aprendizaje (Endy,

2011), estas herramientas permiten la ingeniería racional de organismos mediante el uso de partes genéticas modulares y estandarizadas para simplificar la construcción de moléculas de ADN (Endy, 2011). Entre los estándares disponibles, destaca la tecnología Golden Gate Modular Cloning (MoClo) (Casini *et al.*, 2015), que se basa en enzimas de restricción de tipo IIS. Este sistema permite el ensamblaje eficiente de construcciones multigénicas complejas a partir de partes básicas de genes como promotores, CDS y terminadores en tan solo dos pasos (Engler *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2011). MoClo no sólo acelera el proceso de clonación, sino que también facilita la combinatoria de elementos genéticos y el diseño de vías metabólicas completas (Smanski *et al.*, 2014). Si bien, MoClo es eficiente y versátil, requiere de una inversión inicial en el desarrollo de una biblioteca estandarizada de partes genéticas “domesticadas”, es decir, libres de sitios de restricción tipo IIS y, en su caso, optimizadas en codones para el huésped (según corresponda). Para *C. reinhardtii*, este recurso ya está disponible, un kit abierto de 119 módulos genéticos, validados funcionalmente en diversas cepas, que incluyen promotores, UTRs, terminadores, etiquetas, reporteros, genes de resistencia a antibióticos e intrones clonados en diversas posiciones para permitir la máxima modularidad (Crozet *et al.*, 2018). Este conjunto de herramientas permite la rápida construcción de cepas modificadas genéticamente, agilizando tanto la investigación básica como las aplicaciones biotecnológicas en microalgas.

Producción heteróloga de proteínas en *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii se considera una plataforma potencial para el estudio de la

expresión génica (Rasala and Mayfield 2015), no solo por su estatus GRAS y sus genomas completamente secuenciados (Specht *et al.*, 2010), sino también por características genómicas distintivas. Entre estas destacan un genoma nuclear rico en GC (62-68%) y un genoma cloroplástico predominantemente AT (Franklin *et al.*, 2002). No obstante, la inserción aleatoria de ADN en el núcleo (con un tamaño de aproximadamente 121 Mb) suele asociarse con deleciones y un bajo nivel de expresión de proteínas heterólogas, lo que representa un desafío para la obtención de mutantes estables (Harris, 2001). Por el contrario, el genoma del cloroplasto (195 kb), que presenta una estructura de repeticiones invertidas similar al de plantas terrestres (Harris, 2001), ofrece una ruta alternativa para la expresión.

Los niveles de expresión de proteínas heterólogas dependen de diversos factores, como la optimización de codones de proteínas recombinantes, la secuencia promotora, las regiones no traducidas (UTR), el silenciamiento génico, las proteasas y otras moléculas presentes en el medio de cultivo. Otro factor crítico que afecta la expresión son los clones generados que no se mantienen en condiciones selectivas (Doron *et al.*, 2016; Cutolo *et al.*, 2022). La tabla 1 muestra un resumen, a partir del año 2010, de las biomoléculas expresadas en *C. reinhardtii*, su organelo genéticamente transformado, el porcentaje de expresión de la proteína soluble total, la concentración en miligramos por litro y el vector de clonación. La mayoría de los estudios sobre expresión heteróloga de proteínas en microalgas se han centrado en *C. reinhardtii* como organismo modelo por su facilidad de cultivo y manipulación genética. Además, la producción heteróloga de proteínas ha sido factible tanto en núcleo como en el cloroplasto (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las biomoléculas expresadas heterológamente en *C. reinhardtii*, su organelo genéticamente transformado, porcentaje de expresión de la proteína soluble total, concentración en miligramos por litro y el vector de clonación.

Proteína heteróloga	Organelo donde se efectuó la expresión	*Porcentaje en la proteína soluble total (%)	Expresión (mg/L)	Vector	Referencia
14FN3 (14va fibronectina humana tipo dominio III)	Cloroplasto	3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Rasala <i>et al.</i> 2010 [43]
VEGF (factor de crecimiento vascular)	Cloroplasto	2	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Rasala <i>et al.</i> 2010 [43]

Artículos

endotelial humano) Endolysins-Pal y Cpl1	Núcleo	1	1.3 mg/gDCW	Sitio de inserción <i>psbH</i> /vector pSRSap/promotor <i>psaA</i>	Stoffels <i>et al.</i> 2017 [64]
Hormona de crecimiento	ND	ND	0.5	Sitio de inserción <i>psbH</i> /vector pASapl/promotor <i>psaA</i> y <i>atpA</i>	Wannathong <i>et al.</i> 2016 [65]
Xilanasas	Núcleo	0.25	ND	Sistema de expresión Ble 2A	Rasala <i>et al.</i> 2012 [67]
Inmunotoxina (α CD22H - CH23PE40)	Cloroplasto	0.2-0.3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Tran <i>et al.</i> 2013 [42]
CD22Gel (CD22-scFv ligado a gelonina, una proteína que inactiva el ribosoma de <i>G. multiflorum</i>)	Cloroplasto	0.2-0.3	ND	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Tran <i>et al.</i> 2013 [42]
PFs25 (proteína de superficie de 25 kDa de <i>Plasmodium falciparum</i>)	Cloroplasto	0.5	125	<i>psbA</i> /cepa deficiente D1	Gregory <i>et al.</i> 2013 [54]
NCQ proteína sintética con péptidos bioactivos que presentan diferentes actividades	Cloroplasto	0.16-2.4	ND	Sitio de inserción <i>tscA</i> /promotores <i>rbcl</i> o <i>atpA</i>	Campos-Quevedo <i>et al.</i> 2013 [60]
Proteína del papilomavirus humano tipo 16 E7, mutante atenuada (E7GGG)	Cloroplasto	0.12	ND	Sitio de inserción /vector pCG2/ promotor <i>psbD</i>	Demurtas <i>et al.</i> 2013
Angiotensina II fusionado al antígeno de la cápsida del virus de Hepatitis B (HbcAg)	Núcleo	0.05	ND	Sitio de inserción random / cassette del vector HbcAgl / promotor CaMV 35S	Soria-Guerra <i>et al.</i> 2014

ND: No disponible

*Expresión (%) a partir de la proteína soluble total.

La producción de proteínas heterólogas se ha establecido en diversos sistemas, como bacterias, levaduras, plantas, animales transgénicos y células de mamíferos (Wang *et al.*, 2019; Mi *et al.*, 2020; Morin *et al.*, 2020). Sin embargo, cada plataforma presenta limitaciones significativas en comparación con *C. reinhardtii*. Por ejemplo, los sistemas bacterianos carecen de la maquinaria para modificaciones postraduccionales complejas y con frecuencia presentan dificultades en el plegamiento y ensamblaje de proteínas multiméricas (Potvin and Zhang, 2010). Las levaduras, aunque eucariotas, tienden a realizar hiperglucosilación de las proteínas recombinantes, lo que puede alterar su función biológica o inducir respuestas

inmunogénicas no deseadas, limitando así su aplicabilidad terapéutica (Serrano, 2001). Por otra parte, los sistemas basados en células de mamíferos e insectos implican elevados costos de cultivo, medios complejos y una mayor susceptibilidad a la contaminación microbiana (Serrano 2001; Schirrmann *et al.*, 2008). Frente a estas desventajas, *C. reinhardtii* surge como una alternativa que las supera en gran medida, al ofrecer un sistema de expresión eucariota completo, de bajo costo y con perfil GRAS. El desafío principal radica en su aún bajo rendimiento proteico en comparación con estas plataformas tradicionales. Sin embargo, esta limitación podría superarse en el futuro mediante estrategias integradas que combinen el

escalado en biorreactores, la optimización de los bioprocesos y el continuo avance en las herramientas de ingeniería genética específicas para esta microalga.

Del gen al pigmento: Producción de melanina

La melanina es un biopolímero que cumple funciones cruciales en la fotoprotección contra la radiación ultravioleta, la resistencia al estrés oxidativo y la adaptación a condiciones ambientales extremas. Cabe mencionar que este pigmento deriva su nombre "melanina" de "melanos", una antigua palabra griega para negro (Tran-Ly *et al.*, 2020). En los humanos, la melanina es el pigmento prominente responsable del color de la piel, el cabello y los ojos (Tran-Ly *et al.*, 2020). Su estructura polimérica y naturaleza aromática le confieren propiedades únicas, entre las que destacan su capacidad de absorber un amplio espectro de radiación, actuar como intercambiador catiónico, funcionar como semiconductor amorfo y en algunos casos, exhibir actividad antimicrobiana y antiviral (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Estas características han motivado su creciente exploración en campos tan diversos como la biomedicina, la cosmética, la electrónica orgánica y el desarrollo de biomateriales avanzados. No obstante, su producción a escala industrial se ha visto limitada por los métodos convencionales, a menudo costosos y poco sostenibles, lo que ha incentivado la búsqueda de sistemas de producción alternativos (Tsouko *et al.*, 2023; Menichetti *et al.*, 2024). Entre los distintos tipos de melanina, las eumelaninas, caracterizadas por su coloración que oscila entre el marrón y el negro, son las más abundantes y mejor estudiadas. Su biosíntesis se inicia con la oxidación de L-tirosina, proceso catalizado principalmente por la enzima tirosinasa (EC 1.14.18.1), una monooxigenasa dependiente de cobre. Esta enzima lleva a cabo la hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA y posteriormente oxida este compuesto a dopacromo, el cual se polimeriza de manera espontánea para formar eumelanina (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Estructuralmente, las tirosinasas presentan un sitio activo con dos átomos de cobre coordinados por residuos de histidina, lo que les confiere la capacidad de interactuar con el oxígeno molecular y catalizar reacciones de oxidación altamente específicas.

Recientemente, las tirosinasas de origen bacteriano han despertado especial interés debido a su mayor estabilidad y propiedades bioquímicas distintivas en comparación con las de origen fúngico. Entre ellas, la tirosinasa codificada por el gen *melA* de *Rhizobium etli* CFN42 ha sido ampliamente caracterizada (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006; Chávez-Béjar *et al.*, 2013; Scranton *et al.*, 2015). Entre las plataformas microbianas, *Escherichia coli* se ha consolidado como el sistema preferente para la producción recombinante de esta enzima. Cuando se expresa en *E. coli*, la tirosinasa MelA demuestra una alta eficiencia en la síntesis de eumelanina a partir de L-tirosina (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006). Una ventaja fundamental es su mayor afinidad por la L-tirosina que por la L-DOPA, lo que minimiza la acumulación de intermediarios inestables y favorece una ruta de síntesis más directa. El desarrollo de cepas de *E. coli* genéticamente optimizadas ha permitido aumentar la disponibilidad del precursor L-tirosina, mejorando los rendimientos. Este sistema presenta ventajas notables, como su alta densidad celular, crecimiento rápido y la disponibilidad de herramientas genéticas establecidas. No obstante, a pesar del éxito de *E. coli* como plataforma de expresión, este sistema presenta limitaciones inherentes, como la inactivación térmica de la tirosinasa a 37°C (que obliga a usar temperaturas subóptimas), el consumo competitivo de L-tirosina endógena que inhibe el crecimiento celular y la acumulación intracelular de intermediarios reactivos. Estas desventajas subrayan la necesidad de explorar sistemas de expresión alternativos, más allá de los modelos bacterianos tradicionales, que permitan una producción de melanina más eficiente y sostenible.

¿Del sol a la melanina? La biofábrica del AlgaeLab IBT-UNAM

La expresión heteróloga del gen *melA* en *C. reinhardtii* representa un área prácticamente inexplorada. Si bien, la producción de eumelanina mediante este gen se ha demostrado viable en bacterias, no existen reportes previos de su síntesis en microalgas. Este vacío de conocimiento representa una oportunidad para desarrollar un sistema de producción eucariota y fotosintético para la producción de melanina, que podría superar limitaciones asociadas a *E. coli*, tales como la

inestabilidad termal de la enzima y la toxicidad de intermediarios. Además, se plantea la hipótesis de que el ambiente intracelular de *C. reinhardtii*, con sus compartimentos subcelulares especializados y su maquinaria metabólica organizada, podría promover un plegamiento más eficiente de la tirosinasa MelA, así como una biosíntesis más estable y eficaz del polímero.

La elección de *C. reinhardtii* como hospedero alternativo se fundamenta directamente en sus ventajas fisiológicas. Su rango de temperatura de cultivo óptimo (25-28°C) es ideal para la actividad de la termolábil tirosinasa MelA, resolviendo el principal cuello de botella en *E. coli*. Asimismo, su capacidad de crecer de manera fotoautotrófica utilizando CO₂ permite concebir un proceso de bioproducción sustancialmente más económico y sostenible, al eliminar la necesidad de fuentes de carbono orgánicas costosas.

Finalmente, se espera que el contexto metabólico único de esta microalga, capaz de sintetizar su propio precursor L-tirosina de manera fotoautotrófica, favorezca un suministro eficiente del sustrato para la síntesis del polímero.

En conjunto, los antecedentes delinean un panorama donde la melanina es un biopolímero de gran valor biotecnológico, el gen *melA* de *R. etli* es un biocatalizador robusto y bien caracterizado y *E. coli* ha servido como sistema inicial para demostrar la factibilidad de su producción recombinante. Sin embargo, trasladar esta estrategia a *C. reinhardtii* no solo representa un reto, sino

también una innovación tecnológica con implicaciones en la bioproducción sustentable de eumelanina, integrando la biología sintética con el potencial de los organismos fotosintéticos. Por estas razones y con base en los antecedentes descritos previamente, el presente trabajo realizado en nuestro laboratorio plantea evaluar la viabilidad de la expresión heteróloga del gen *melA* de *R. etli* (que codifica para una tirosinasa involucrada en la síntesis de melanina) en el citoplasma de *C. reinhardtii* usando el sistema MoClo. La estrategia general de nuestro trabajo se muestra en la Figura 1, en donde se pueden apreciar los tres puntos clave del proceso de generación de las cepas transgénicas: A) diseño y construcción, B) transformación y selección y C) producción y caracterización.

En este estudio, nuestros resultados indicaron que la transformación de *C. reinhardtii* UVM4 con el vector MelAL2 fue exitosa, ya que se observó la pigmentación en los cultivos transformados, un indicativo directo de la síntesis de melanina (Figura 2, matraces). Además, la expresión del transgén se confirmó cuantitativamente con la medición de la proteína fluorescente mRuby2, donde las cepas transformadas presentaron niveles significativamente más altos de fluorescencia (hasta 120 RFU, $p < 0.05$) en comparación con las cepas control UVM4 y CC125. Adicionalmente, la cuantificación de melanina en el sobrenadante de cultivo (Tabla 2), reveló que algunas de las cepas transformadas presentaron valores de absorbancia a 400 nm, superiores a los controles no transformados.

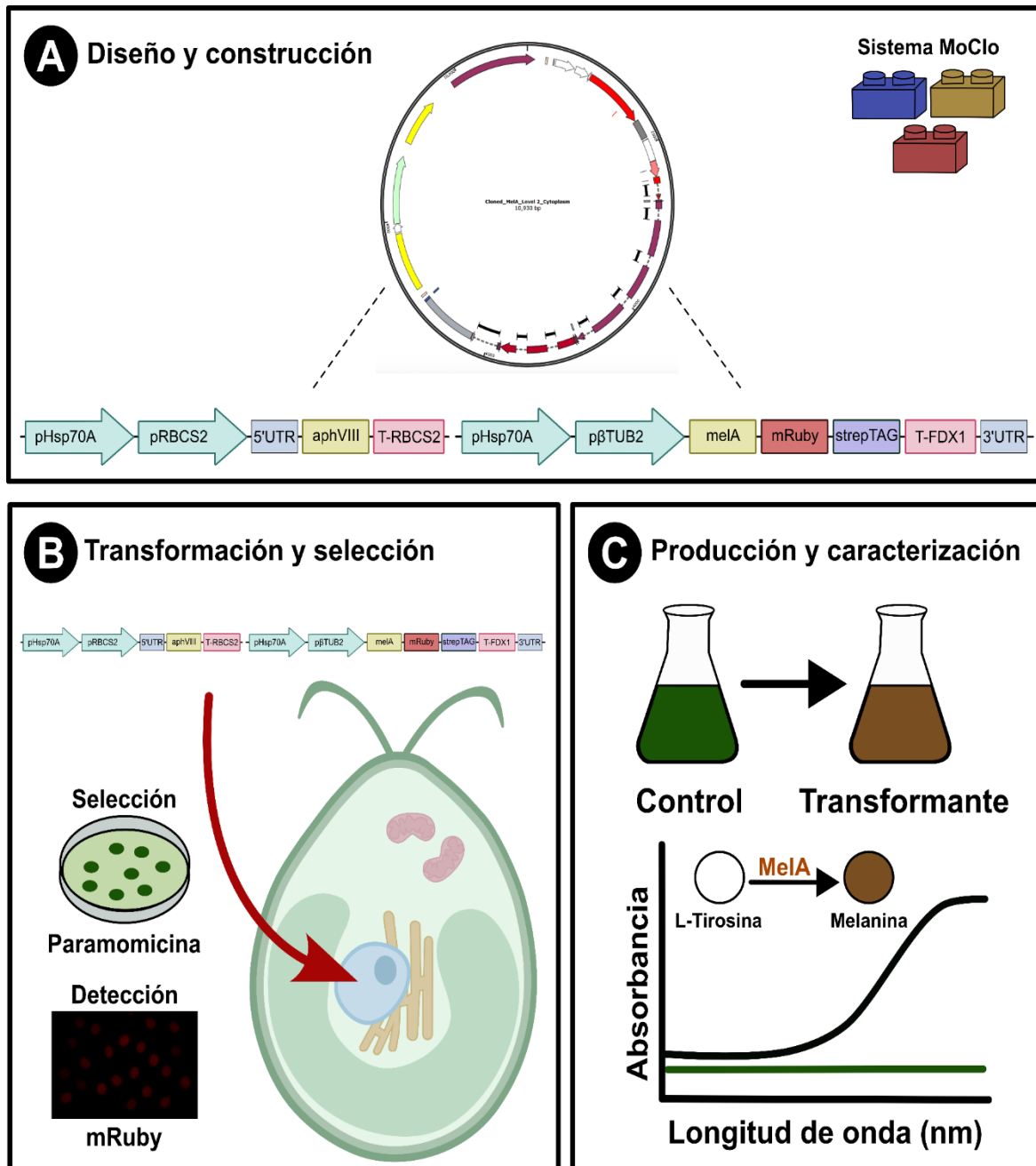


Figura 1. Estrategia para el desarrollo de una fábrica fotosintética de melanina en *Chlamydomonas reinhardtii*. (A) Diseño del vector de expresión MelAL2 mediante el sistema MoClo, mostrando los elementos modulares: casete de resistencia a paramomicina y unidad transcripcional con el gen *melA* de *R. etli*, el reportero mRuby2 y la etiqueta StrepTAG bajo el control de promotores HSP70A-RBCS2. (B) Transformación de *C. reinhardtii* UVM4 y selección de clones transformantes basada en resistencia a paramomicina y fluorescencia mRuby2. (C) Evidencia fenotípica y bioquímica de la producción de melanina: cambio de color en cultivos líquidos, espectro de absorción característico en el sobrenadante y representación esquemática de la conversión de L-tirosina a melanina por la tirosinasa MelA funcional.

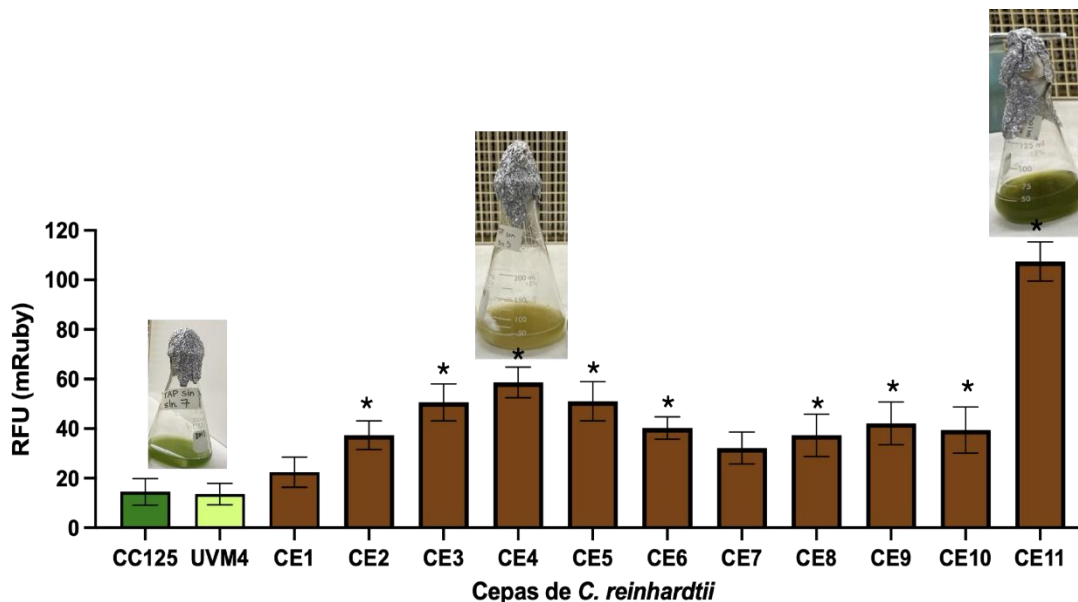


Figura 2. Niveles de RFU asociados a la fluorescencia de mRuby2 en cepas transformadas y producción de melanina en sobrenadante. Los asteriscos en las barras denotan diferencias significativas con respecto a la cepa parental UVM4 y cepa silvestre CC125 (análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de diferencias significativas honestas (HSD) *post-hoc* Tukey ($p < 0.05$)).

Tabla 2. Producción de melanina en algunas cepas transgénicas seleccionadas.

Cepa	Melanina en sobrenadante (DO_{400nm}/g_{DCW})
UVM4	0
CE4	1.9
CE6	2.46
CE7	2.5
CE10	1.62

Conclusiones

La expresión exitosa del gen *melA* de *R. etli* en *C. reinhardtii* y la posterior producción de melanina demuestran la viabilidad de esta microalga como plataforma de expresión eucariota para enzimas complejas y metabolitos de alto valor biotecnológico. Este logro no solo valida la funcionalidad de la tirosinasa bacteriana MelA en un contexto algal, sino que también confirma la capacidad de *C. reinhardtii* para suministrar el precursor L-tirosina y catalizar las reacciones de polimerización necesarias. Este hallazgo es de particular relevancia biotecnológica, ya que constituye, según nuestro conocimiento, el primer reporte de producción de melanina en

microalgas. Los resultados obtenidos posicionan a *C. reinhardtii* como una alternativa sostenible y prometedora a los sistemas bacterianos tradicionales, superando limitaciones clave como la termolabilidad de la tirosinasa y el uso de fuentes de carbono orgánicas. Al aprovechar su metabolismo fotosintético, este sistema representa un avance significativo hacia procesos de producción más ecológicos y económicamente viables. Futuras investigaciones deberán centrarse en incrementar la productividad de melanina mediante estrategias de ingeniería metabólica, evaluar la escalabilidad en biorreactores y explorar las propiedades

fisicoquímicas de la melanina algal para aplicaciones biotecnológicas específicas

Referencias

Arredondo BOR & Vázquez-Duhalt R (1991) Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo* 17, 99-111.
Banerjee A & Ward V (2022) Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae. *Current Opinion in Biotechnology* 78, 102784.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102784>

Cabrera-Valladares N, Martínez A, Piñero S, Lagunas-Muñoz VH, Tinoco R, de Anda R, Vázquez-Duhalt R, Bolívar F, & Gosset G (2006). Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 772-779.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.004>

Casini A, Storch M, Baldwin GS, & Ellis T (2015) Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16, 568-576.

<https://doi.org/10.1038/nrm4014>

Chávez-Béjar, M. I., Balderas-Hernandez, V. E., Gutiérrez-Alejandre, A., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to optimize melanin synthesis from glucose. *Microbial cell factories*, 12, 108.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-108>

Crozet P, Navarro FJ, Willmund F, Mehrshahi P, Bakowski K, Lauersen KJ, Pérez-Pérez ME, Auroy P, Rovira AG, Sauret-Gueto S, et al. (2018) Birth of a photosynthetic chassis: a MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synthetic Biology* 7, 2074-2086.

<https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00251>

Cutolo EA, Mandalà G, Dall'osto L, Bassi R (2022) Harnessing the algal chloroplast for heterologous protein production. *Microorganisms* 10, 743.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040743>

Doron L, Segal N, Shapira M (2016) Transgene Expression in Microalgae—From Tools to Applications. *Frontiers in Plant Science* 7, 505.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00505>

Endy D (2011) Building a new biology. *Comptes Rendus Chimie* 14, 424-428.

<https://doi.org/10.1016/j.crci.2010.11.013>

Engler C, Kandzia R, & Marillonnet S (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One* 3, e3647.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>

Franklin S, Ngo B, Efuet E, Mayfield SP (2002) Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal* 30, 733-744.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01319.x>

Guo Y, Xiong H, Fan Q, & Duanmu D (2024) Heterologous gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast by heterologous promoters and terminators, intercistronic expression elements and minichromosome, *Microbiology and Biotechnology* 17(12), e70069.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.70069>

Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 52, 363-406.

<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>

Harris EH, Stern DB, Witman GB (2009) *The Chlamydomonas Sourcebook*. Second Edition, Academic Press, Oxford.

Khavari F, Saidijam M, Taheri M, & Nouri F (2021) Microalgae: therapeutic potentials and applications. *Molecular Biology Reports* 48, 4757.

<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>

Maeda, K., Owada, M., Kimura, N., Omata, K., & Karube, I. (1995). CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management*. Jun-Sept 1995; 36(6-9), 717-720.

[https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00105-M](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00105-M)

Artículos

- Masi A, Leonelli F, Scognamiglio V, Gasperuzzo G, Antonacci A, & Terzidis MA (2023) *Chlamydomonas reinhardtii*: a factory of nutraceutical and food supplements for human health. *Molecules* 28(3), 1185. <https://doi.org/10.3390/molecules28031185>
- Mata, T. M., Martinis, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Jan 2010; 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, dePamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *The Plant Cell* 14(11), 2659-2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.006155>
- Menichetti, A., Mordini, D., Vicenzi, S., & Montalti, M. (2024). Melanin for photoprotection and hair coloration in the emerging era of nanocosmetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11), 5862. <https://doi.org/10.3390/ijms25115862>
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Metting Jr FB (1996) Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 17(5-6), 477-489. <https://doi.org/10.1007/BF01574779>
- Mi Y, Zhu Z, Qian G, Li Y, Meng X, Xue J, Chen Q, Sun W, Shi Y (2020) Inducing hairy roots by *Agrobacterium* rhizogenes mediated transformation in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Journal of Visualized Experiments* 157, e60828. <https://doi.org/10.3791/60828>
- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE & Yang JW (2013) Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research* 2(4), 325-357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.003>
- Morales-Sánchez D, Kim Y, Terng EL, Peterson L, & Cerutti H (2017) A multidomain enzyme, with glycerol-3-phosphate dehydrogenase and phosphatase activities, is involved in a chloroplastic pathway for glycerol synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 90: 1079-1092. <https://doi.org/10.1111/tpj.13530>
- Morales-Sánchez D, Martínez-Rodríguez A & Martínez A (2015) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1773-2>
- Morin N, Czerwiec Q, Nicaud JM, Neuvéglise C, Rossignol T (2020) Transforming *Candida hispaniensis*, a promising oleaginous and flavogenic yeast. *Yeast* 37, 348–355. <https://doi.org/10.1002/yea.3466>
- Popescu CE & Lee RW (2007) Mitochondrial genome sequence evolution in *Chlamydomonas*. *Genetics* 175, 819-826. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063156>
- Potvin G, & Zhang Z (2010) Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnology Advances* 28, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.006>
- Rasala BA & Mayfield SP (2011) The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioengineered Bugs* 2(1), 50-54. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.1.13423>
- Riekhof WR, Sears BB, & Benning C (2005) Annotation of genes involved in glycerolipid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: discovery of the betaine lipid synthase BTA1Cr. *Eukaryotic Cell* 4, 242-252. <https://doi.org/10.1128/ec.4.2.242-252.2005>
- Schirrmann T, Al-Halabi L, Dübel S, Hust M (2008) Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience-Landmark: a journal and virtual library* 13, 4576–4594. <https://doi.org/10.2741/3024>
- Scranton, M. A., Ostrand, J. T., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2015). *Chlamydomonas* as a model for biofuels and bio-products

Artículos

production. *The Plant Journal*, 82(3), 523–531.

<https://doi.org/10.1111/tpj.12780>

Serrano AG (2001) Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia Pastoris*. Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, 2001.

Siddiqui A, Wei Z, Boehm M, & Ahmad N (2020) Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 67, 30-40.

<https://doi.org/10.1002/bab.1823>

Smanski MJ, Bhatia S, Zhao D, Park Y, Woodruff BAL, Giannoukos G, Ciulla D, Busby M, Calderon J, Nicol R, Gordon DB, Densmore D, & Voight CA (2014) Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly. *Nature Biotechnology* 32, 1241-1249.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3063>

Specht E, Miyake-Stoner S, Mayfield S (2010) Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters* 32, 1373–1383.

<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>

Torres-Tiji Y, Fields FJ & Mayfield SP (2020) Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances* 41, 107536.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>

Tran-Ly, A.N., Reyes, C., Schwarze, F.W.M.R. et al. Microbial production of melanin and its

various applications. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 170 (2020).

<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02941-z>

Tsouko, E., Tolia, E., & Sarris, D. (2023). Microbial melanin: Renewable feedstock and emerging applications in food-related systems. *Sustainability*, 15(9), 7516.

<https://doi.org/10.3390/su15097516>

Urme SRA, Barth L, Serrano-Carreón L, Martínez A & Morales-Sánchez D (2025) Mixotrophic cultivation of polar microalga *Chlamydomonas* sp. RCC2488 (Malina) using potato peel hydrolysates as carbon source. *BioEnergy Research* 18, 28.

<https://doi.org/10.1007/s12155-025-10829-9>

Wang L, Yang L, Wen X, Chen Z, Liang Q, Li J, Wang W (2019) Rapid and high-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by square-wave electroporation. *Bioscience Reports* 39, BSR20181210.

<https://doi.org/10.1042/BSR20181210>

Wannathong T, Waterhouse JC, Young RE, Economou CK, & Purton S (2016) New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 5467-5477.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7354-6>

Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, & Marillonnet S (2011) A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE* 6, e16765.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>