



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

**OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MUTANTS DE
Rhodosporidium toruloides PER A LA BIOTRANSFORMACIÓ
D'HIDROLITZAT VEGETAL**

Alba Singla Arnau

Treball Final de Grau Biotecnologia

Tutor acadèmic i supervisor: Ricardo Román Cordero Otero,
Dep. Bioquímica i Biotecnologia (ricardo.cordero@urv.cat)

Tarragona, 3 de Setembre de 2025

Setembre 2025

Jo, Alba Singla Arnau, amb DNI 49317862-C, soc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.



Tarragona, 3 de Setembre de 2025

Aquest projecte és el resultat de les pràctiques extra-curriculars realitzades al Grup Biotecnologia Microbiana dels Aliments de la Universitat Rovira i Virgili, sota la supervisió del professor Ricardo Román Cordero Otero.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria expressar el meu més profund agraïment al meu tutor Ricardo, per donar-me l'oportunitat de dur a terme aquest treball. Li agraeixo sincerament el temps i els coneixements que ha compartit amb tanta generositat, així com la seva guia i suport constant al llarg de tot aquest procés. Gràcies per apropar-me una mica més al món de la microbiologia, per la teva dedicació i per transmetre'm la passió per la recerca.

També vull agrair a tots els professionals i companys amb qui he coincidit durant aquesta etapa, que han contribuït a fer d'aquesta experiència un aprenentatge encara més enriquidor en l'àmbit personal.

Finalment, vull donar les gràcies de tot cor a la meva família, amics i parella per haver estat sempre al meu costat, pel seu suport i per ser la meva motivació al llarg d'aquest camí.

Gràcies a tots, aquest treball no hauria estat el mateix sense la vostra ajuda i suport.

ABREVIACIONS

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

AG: àcids grassos

ALE: evolució adaptativa al laboratori

ARA: àcid araquidònic

ARTP: plasma atmosfèric a temperatura ambient

BrEt: bromur d'etidi

CDW: pes cel·lular sec

DO: densitat òptica

EMS: etil metà sulfonat

FAS: complex d'enzims de la síntesi d'àcids grassos

FDA: administració d'aliments i medicaments dels EUA

GMO: organisme genèticament modificat

GRAS: organisme reconegut generalment com a segur

IPP: isopentenil pirofosfat

MVA: mevalonat

NTG: nitrosoguanidina

PUFAs: àcids grassos poliinsaturats

ROS: espècies reactives d'oxigen

TAG: triacilglicèrids

UV: radiació ultraviolada

RESUM

En els darrers anys, la demanda de biocombustibles ha experimentat un creixement sostingut a escala mundial, impulsat per la necessitat de reduir les emissions de gasos d'efecte hivernacle i de potenciar l'ús de fonts d'energia renovables. Entre aquests combustibles destaca el biodièsel, amb previsions que situen el mercat mundial en 226.600 milions de dòlars l'any 2034 amb una taxa de creixement anual del 6,9% (Jha 2024). En aquest context, el llevat oleaginós *Rhodospiridium toruloides* es presenta com un microorganisme prometedori per la seva gran capacitat de sintetitzar i acumular lípids, els quals poden ser transformats en biodièsel mitjançant processos de transesterificació.

Tanmateix, per tal que l'ús de *R. toruloides* sigui viable a escala industrial, cal optimitzar els processos productius mitjançant estratègies com l'ús de substrats de baix cost o el desenvolupament de soques més eficients en la biotransformació. El present treball se centra en l'ús d'hidrolitzats vegetals com a font de carboni alternativa i econòmica.

La principal limitació d'aquests substrats és la presència de compostos inhibidors del creixement, que requereixen passos addicionals de desintoxicació i afecten la rendibilitat del procés. Per aquest motiu, es planteja com a objectiu principal obtenir mutants de *R. toruloides* més resistents a aquests inhibidors, amb una capacitat millorada per a la biotransformació d'hidrolitzat de biomassa vegetal. Mitjançant tècniques de mutagènesi aleatòria, combinades amb l'adaptació evolutiva al laboratori, s'han obtingut mutants capaços de tolerar concentracions d'inhibidor 7 vegades superiors a les que se solen trobar en els hidrolitzats vegetals. Aquests resultats constitueixen un avenç en el desenvolupament de processos més eficients i sostenibles, oferint una plataforma robusta per a la producció a gran escala de diversos compostos d'interès biotecnològic.

Paraules clau: *Rhodospiridium toruloides*, substrats de baix cost, inhibidors d'hidrolitzat vegetal, mutagènesi aleatòria.

TAULA DE CONTINGUTS

1. INTRODUCCIÓ.....	8
1.1. Descripció de <i>Rhodosporidium toruloides</i>	8
1.2. Aplicacions biotecnològiques de <i>R. toruloides</i>	10
1.3. Metabolisme secundari de <i>R. toruloides</i>	11
1.4. Substrats de baix cost.....	14
1.5. Construcció de soques de llevats millorades.....	15
1.6. Optimització de llevats i fongs.....	19
1.7. Soques millorades de <i>R. toruloides</i>	21
2. HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS.....	23
3. MATERIALS I MÈTODES.....	24
3.1. Llevat, medis i condicions de cultiu.....	24
3.2. Mutagènesi.....	24
3.3. Adaptació evolutiva al laboratori.....	24
3.4. Avaluació del creixement dels mutants.....	25
3.5. Avaluació de fenotips d'interès.....	25
3.6. Validació microscòpica dels mutants.....	25
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	26
4.1. Mutagènesi de <i>R. toruloides</i>	26
4.2. Adaptació evolutiva de <i>R. toruloides</i> resistent a inhibidors d'hidrolitzats lignocelul·lòsics.....	28
4.3. Avaluació del creixement dels mutants resistents.....	30
4.4. Colònies de <i>R. toruloides</i> amb altres fenotips d'interès.....	32
4.5. Validació microscòpica dels mutants.....	34
4.6. Limitacions i futures perspectives.....	36
5. CONCLUSIONS.....	39
6. BIBLIOGRAFIA.....	40
7. AUTOAVALUACIÓ.....	43

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Descripció de *Rhodosporidium toruloides*

Rhodosporidium toruloides, també conegut com a *Rhodotorula toruloides* segons classificacions taxonòmiques més recents, és un llevat oleaginós de color vermell que pertany a la família *Sporidiobolaceae*, ordre *Sporidiobolales*, classe *Microbotryomycetes* i fílum *Basidiomycota*. Aquesta espècie va ser aïllada per primera vegada l'any 1.922 a l'aire de Dalian (Xina) i inicialment va ser anomenada *Torula rubescens* (Wen et al. 2020).

El cicle de vida de *R. toruloides* està representat a la *Figura 1*. Aquest llevat pot alternar entre formes haploides i diploides i presenta dimorfisme, regulat per factors com la disponibilitat de nutrients, l'estrès o factors ambientals com el pH (Wen et al. 2020; Yu Zhao et al. 2022).

El canvi de morfologia té un paper important en l'adaptació i desenvolupament de l'espècie. En condicions normals, tant les formes haploides com les diploides presenten una morfologia unicel·lular, típica de llevat, i es reproduïxen de forma asexual per gemmació. En canvi, quan les condicions són desfavorables, es desenvolupa la forma filamentosa diploide que produeix espores resistents. Quan les condicions tornen a ser favorables, aquestes espores donen lloc a llevats haploides, si es dona un procés meiòtic, o bé diploides, si es produeix un procés mitòtic.

Si la soca de partida és haploide, sota l'estrès ambiental els llevats entren en el cicle sexual: es fusionen dues soques compatibles, denominades A i a, que donen lloc a una hifa diploide. En canvi, quan la soca de partida és diploide, la forma filamentosa es desenvolupa per un canvi morfològic, independentment del cicle sexual (Abe i Sasakuma 1986). Es tracta d'un llevat heterotàl·lic, per la qual cosa el fenotip A/a es manté al llarg de les generacions en els individus haploides.

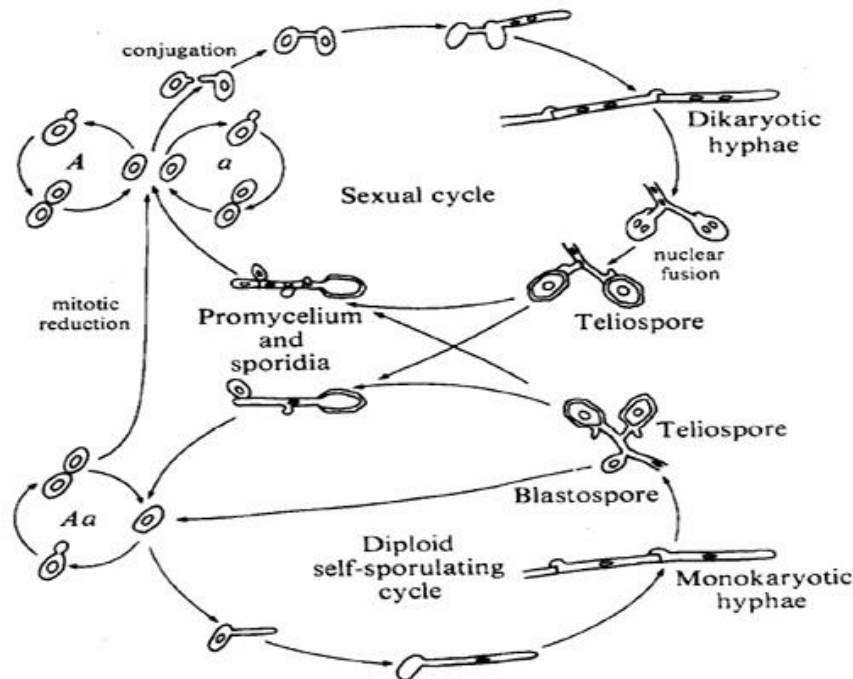


Figura 1. Cicle de vida de *R. toruloides* proposat per Abe i Sasakuma (1986).

R. toruloides és especialment atractiu des del punt de vista biotecnològic per la seva gran versatilitat metabòlica. Tot i que no té capacitat fermentativa, pot utilitzar una àmplia varietat de fonts de carboni tant per al creixement com per a la producció d'energia, entre les quals hi ha monosacàrids com la glucosa i xilosa, oligosacàrids com la sacarosa, maltosa, cel·lobiosa, trehalosa, rafinosa i melezitosa, alcohols com etanol, glicerol, mannitol i sorbitol, àcids orgànics com acetat, lactat, succinat i citrat, i àcids grassos (AG) de cadena llarga com l'àcid D-galacturònic. Aquesta flexibilitat li permet créixer en ambients naturals diversos com el sòl, aigües marines, aigües residuals, pasta de fusta de pi o fulles vegetals (Wen et al. 2020). A més, presenta una gran tolerància a condicions ambientals adverses. Pot créixer a diferents temperatures i valors de pH, arribant a tolerar pHs de fins a 2,5 (Gadanhó, Libkind, i Sampaio 2006).

Adicionalment, *R. toruloides* és considerat com a organisme GRAS (*Generally Recognized As Safe*) per la FDA (Administració d'Aliments i Medicaments dels EUA). Aquesta classificació permet el seu ús en processos productius sense necessitat d'una autorització reguladora específica prèvia, facilitant el seu ús a escala industrial i el desenvolupament i la comercialització dels productes derivats.

1.2. Aplicacions biotecnològiques de *R. toruloides*

Les aplicacions més clàssiques de *R. toruloides* es basen en la seva capacitat per produir lípids i carotens. Per una banda, els triacilglicèrids (TAG) representen una font renovable per a la producció de biocombustibles, cosmètics, lubricants biodegradables i additius alimentaris. Per altra banda, els carotenoides s'utilitzen en la producció de colorants naturals en la indústria alimentària, com a principis actius en productes cosmètics i com a agents protectors cel·lulars i suplementos nutricionals en l'àmbit farmacèutic, per les seves propietats antioxidants, fotoprotectors i provitamíniques. Addicionalment, certs carotens com el torulè i la torularodina han mostrat un gran potencial com a compostos anticancerígens (Yu Zhao et al. 2022), fet que obre la porta a futures aplicacions en l'àmbit mèdic.

Gràcies a l'ús de l'enginyeria genètica, *R. toruloides* ha adquirit nous usos biotecnològics mitjançant la introducció de rutes biosintètiques específiques. S'han obtingut soques modificades capaces de produir compostos aromàtics com el resveratrol (M. Zhang et al. 2022), reconegut per les seves propietats antioxidants i antiinflamatòries, així com terpens i poliquètics com l'àcid triacètic-lactona, que tenen aplicacions potencials en la fabricació de materials, productes farmacèutics i compostos químics d'interès industrial (Otopal et al. 2022).

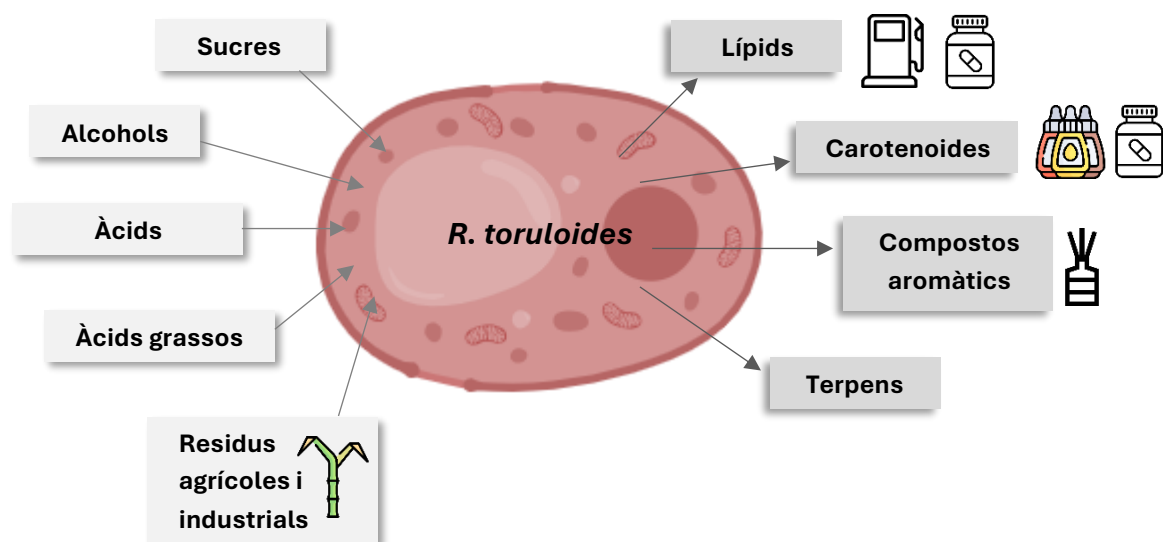


Figura 2. Representació esquemàtica dels productes d'interès industrial obtinguts a partir de *R. toruloides*, partint d'una gran varietat de matèries primeres com residus, àcids grassos, àcids orgànics, glicerol o sucres.

1.2.1. Mercat de lípids i carotens

En els últims anys s'està produint un augment de la demanda de biocombustibles a escala mundial, impulsada per la necessitat de reduir les emissions de gasos d'efecte hivernacle i promoure l'ús de fonts d'energia renovables (Jha 2024). Entre aquests combustibles destaca el biodièsel, que s'obté mitjançant la transesterificació de lípids, en un procés en què es fan reaccionar TAG amb un alcohol, generalment metanol o etanol, i s'obtenen èsters d'AG que poden ser utilitzats com a combustible en motors dièsel.

Segons l'Agència Internacional de l'Energia (IEA), es preveu que la demanda de biocombustibles augmenti en 38.000 milions de litres entre 2023 i 2028, amb el biodièsel com una de les fonts més importants per a la descarbonització del sector del transport (IEA 2024). Concretament, es preveu que el mercat mundial del biodièsel arribi a una valoració de 226.600 milions de dòlars el 2034, amb una taxa de creixement anual del 6,9% (Jha 2024).

Pel que fa als carotens, tot i que no es tracta d'un mercat emergent sinó que està ja força consolidat, s'espera també un creixement sostingut durant els pròxims anys. Segons l'últim estudi de BCC Research, "The Global Market for Carotenoids", està previst que el seu valor passi de 2,1 mil milions de dòlars el 2024 fins a 2,9 mil milions el 2029, amb una taxa de creixement anual composta del 6,7%. Aquest augment es preveu d'acord amb la creixent demanda de suplementos alimentaris, així com la necessitat de substituir els colorants alimentaris sintètics per alternatives naturals (BBC Research 2025). En aquest context, *R. toruloides* sorgeix com un microorganisme prometedore per la seva gran capacitat de produir aquests compostos d'interès econòmic.

1.3. Metabolisme secundari de *R. toruloides*

R. toruloides acumula lípids i carotenoides com a estratègia de resistència davant condicions ambientals adverses. En la fase estacionària del creixement cel·lular, pot arribar a acumular fins a l'1% del seu pes cel·lular sec (CDW) en carotens, i més del 70% del CDW en lípids (Xie et al. 2024; Sztokowski et al. 2023).

D'una banda, els lípids són un component essencial de la membrana cel·lular i, en condicions d'estrès, també poden actuar com a reserva d'energia i carboni. Quan el

llevat detecta que l'entorn és desfavorable, especialment en situacions de limitació de nutrients essencials com el nitrogen, el fòsfor o el sofre, produeix grans quantitats de TAG que s'acumulen a l'espai intracel·lular en forma de gotes lipídiques. Els lípids emmagatzemats garanteixen la supervivència del llevat i permeten que reprengui el creixement quan les condicions tornen a ser favorables.

D'altra banda, els carotenoides són pigments lipofílics naturals que aporten coloracions grogues, taronges i vermelles, i es localitzen a les membranes cel·lulars del llevat i a les gotes lipídiques. *R. toruloides* produeix principalment β -carotè, torulè i torularodina i, en menor mesura, γ -carotè. Tots són compostos isoprenoides C40 sintetitzats a partir del precursor isoprènic isopentenil pirofosfat (IPP) (C5), que deriva de l'acetil-CoA. Els carotenoides són metabòlits secundaris pel que no són essencials pel creixement, la seva síntesi s'activa com a mecanisme protector en resposta a estrès lumínic o presència de sals o metalls pesants, que causen acumulació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i provoquen estrès i dany cel·lular (Xie et al. 2024). La seva activitat es basa en la seva acció antioxidant, que permet protegir estructures cel·lulars delicades davant l'acumulació de ROS, i també actuen com a mecanisme fotoprotector, captant la llum i dissipant l'excés d'energia.

Les capacitats metabòliques de *R. toruloides* es veuen reflectides en el seu genoma, que ha estat completament seqüenciat. Aquest presenta una mida d'aproximadament 20,2 Mbp, amb un contingut de GC del 61,9% i al voltant de 8.171 gens codificants per proteïnes. Tot i ser un llevat no convencional, molt menys estudiat que *Saccharomyces cerevisiae*, les tècniques de biologia de sistemes i l'ús de les ciències òmiques han permès identificar gens i enzims clau del seu metabolisme. Concretament, l'anàlisi genòmica ha revelat la presència de vies metabòliques específiques per a la biosíntesi d'AG absents en altres llevats no oleaginosos, i ha posat de manifest la presència de gens implicats en la resistència a l'estrès ambiental (Wen et al. 2020).

Les rutes biosintètiques de lípids i carotenoides estan representades a la ***¡Error! No s e encuentra el origen de la referencia.*** Durant la lipogènesi, el precursor acetil-CoA és transformat en malonil-CoA, que es converteix en AG a través del complex d'enzims de la síntesi d'AG (FAS) i aquests reaccionen amb glicerol, donant lloc finalment als TAG. En el cas dels carotenoides, la ruta de biosíntesi inclou la via del

mevalonat (MVA), a través de la qual l'acetil-CoA es converteix en isoprenoides i d'aquests en deriva l'IPP. A partir d'aquesta molècula, per acció d'enzims com CAR1 i CAR2, es sintetitzen tots els carotenoides.

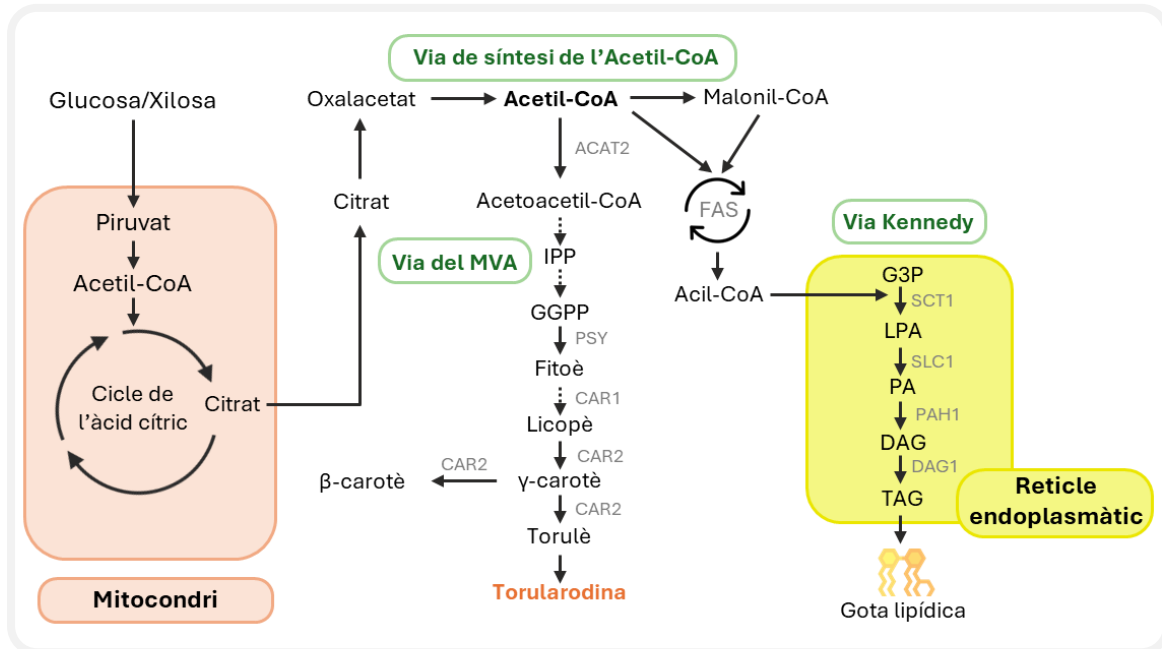


Figura 3. Principals rutes metabòliques de *R. toruloides* implicades en la síntesi de lípids i carotens. Els gens clau implicats en la vi del mevalonat (MVA) i la via Kennedy, es mostren en color gris. Metabòlits involucrats: MVA: mevalonat; IPP: isopentenil pirofosfat; GGPP: geranylgeranyl difosfat; G3P: glicerol-3-fosfat; LPA: àcid lisofosfatídic; PA: àcid fosfatídic; DAG: diacilglicerol; TAG: triacilglicerol. Enzims involucrats: PSY: fitoè sintasa; CAR 1: fitoè desaturasa; CAR 2: licopè ciclasa; FAS: àcid gras sintetasa; SCT1: G3P aciltransferasa; SLC1: 1-acil-sn-glicerol-3-fosfat aciltransferasa; PAH1: fosfatidat fosfatasa; DAG1: diacilglicerol acetiltransferasa. Adaptat de (Wen et al. 2020; Xie et al. 2024; Priyadarshini i Kataria 2025)

Un dels principals reptes associats a la producció de lípids i carotenoides és la interconnexió que hi ha entre la ruta de síntesi dels dos compostos, que comparteixen l'Acetil-CoA com a precursor comú. Aquesta situació dificulta tant la producció simultània optimitzada de lípids i carotenoides com la producció dirigida d'un sol compost. En aquest context, diversos estudis han destacat la importància de regular la relació carboni/nitrogen (C/N) del medi de cultiu. Una relació C/N elevada, que implica una limitació de nitrogen, afavoreix l'acumulació de lípids, mentre que una relació baixa estimula la biosíntesi de carotenoides (Xie et al. 2024).

Tot i el gran potencial de *R. toruloides*, la seva aplicació a gran escala es veu sovint limitada pels costos associats a la producció. Per tal de minimitzar aquests costos i fer viable el seu ús a escala industrial, la recerca actual se centra en l'exploració de substrats de baix cost, l'optimització de les condicions de cultiu i dels processos de recuperació del producte, així com en la millora del rendiment de les soques de *R.*

toruloides, principalment mitjançant tècniques de mutagènesi i edició genètica, per tal d'augmentar l'eficiència global del procés productiu (Yu Zhao et al. 2022).

El present treball abordarà l'ús de substrats de baix cost, amb especial atenció als processos que permeten millorar l'eficiència de *R. toruloides* en la seva utilització.

1.4. Substrats de baix cost

Els substrats de baix cost són materials residuals generats majoritàriament per la indústria agroalimentària, agrícola i ramadera. Aquests residus solen contenir compostos orgànics aprofitables, com ara sucres, àcids orgànics o AG volàtils, que poden ser metabolitzats per diversos microorganismes. El seu ús representa una estratègia clau per reduir els costos de producció en processos biotecnològics, alhora que contribueix a la valorització de residus i a la sostenibilitat ambiental. Entre els substrats més utilitzats es troben el glicerol, els hidrolitzats lignocel·lulòsics, els residus agroalimentaris i les aigües residuals (Wen et al. 2020).

R. toruloides ha estat àmpliament estudiat pel seu potencial en la producció de lípids a partir d'aquests substrats alternatius, mostrant respostes molt variables. A partir de glicerol, s'han assolit valors producció lipídica màxims de 25,72 g/L, mentre que amb residus alimentaris i agrícoles, com les melasses de canya de sucre, s'ha arribat fins a 26,7 g/L. En canvi, l'ús d'aigües residuals ha mostrat una producció més limitada de 2,74 g/L, que augmenta fins a 4,6 g/L mitjançant co-cultius amb *Chlorella pyrenoidosa*. Finalment, en el cas dels hidrolitzats vegetals, s'han obtingut títols lipídics de fins a 39,5 g/L, per la qual cosa representen l'alternativa amb major potencial (Yu Zhao et al. 2022).

Els hidrolitzats vegetals deriven de residus rics en cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina, que formen una matriu compacta difícilment assimilable per *R. toruloides*. Per aquest motiu, cal aplicar pretractaments físics, químics o biològics que permetin alliberar els monosacàrids. El més habitual és utilitzar pretractaments àcids per alliberar hexoses i pentoses com la glucosa i la xilosa. Tanmateix, durant aquest procés també es generen compostos com els fenols, el furfural i el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), que són potents inhibidors del creixement. El furfural deriva de les pentoses, mentre que el 5-HMF s'origina a partir d'hexoses, i la seva formació depèn de la naturalesa de la biomassa i de les condicions de pretractament, com la temperatura, el temps, la

pressió, el pH, les condicions redox i la presència de catalitzadors. Aquests compostos poden reduir l'activitat dels microorganismes, ja que són capaços de fragmentar l'ADN i inhibir la síntesi de proteïnes i ARN. En concret, el furfural inhibeix enzims clau de la glicòlisi com l'hexocinasa o la fosfofructocinasa (Malav et al. 2017).

Després de realitzar un pretractament àcid de la biomassa, és imprescindible una etapa de neutralització amb un agent bàsic a temperatura elevada. En aquest procés, anomenat *overliming*, part dels inhibidors precipita, tot i que s'estima que també es perd aproximadament el 10% dels sucres per adsorció. La resta de compostos inhibidors han de ser eliminats mitjançant estratègies físiques, químiques o biològiques.

Una de les tècniques comunes és l'ús de resines d'intercanvi iònic, que permet reduir fins al 63,4% dels furans i el 75,8% dels fenols en hidrolitzats de melassa de canya de sucre, però té un cost elevat. Alternativament, la desintoxicació biològica representa una operació senzilla i amb menor generació de residus, tot i que es tracta d'un procés lent i menys eficient. Per últim, l'adsorció amb carbó actiu permet eliminar fins el 96% de 5-HMF i el 93% de furfural sense afectar significativament la concentració de sucres del medi (Malav et al. 2017).

Malgrat l'eficiència que poden assolir algunes d'aquestes estratègies, totes impliquen un cost addicional. Per aquest motiu, hi ha un interès creixent en el desenvolupament de soques amb una elevada resistència a aquests compostos, de manera que es pugui prescindir completament de l'etapa de desintoxicació, amb el consegüent estalvi de temps i recursos. En aquest sentit, *R. toruloides* destaca no només per la seva capacitat d'utilitzar substrats lignocel·lulòsics, sinó també per haver demostrat una elevada tolerància a inhibidors derivats de la biomassa, fet que el converteix en un microorganisme especialment robust per a processos industrials sostenibles que permeten valoritzar residus agrícoles o forestals (Wen et al. 2020).

1.5. Construcció de soques de llevats millorades

Hi ha diversos mètodes que s'utilitzen per millorar les característiques dels llevats, principalment amb l'objectiu d'obtenir soques més eficients en la producció de compostos d'interès o amb major resistència a condicions ambientals adverses. A

continuació es descriuen els mètodes més habituals, esquematitzats a la *Figura 4*, així com els avantatges i les limitacions que presenten cadascun d'ells.

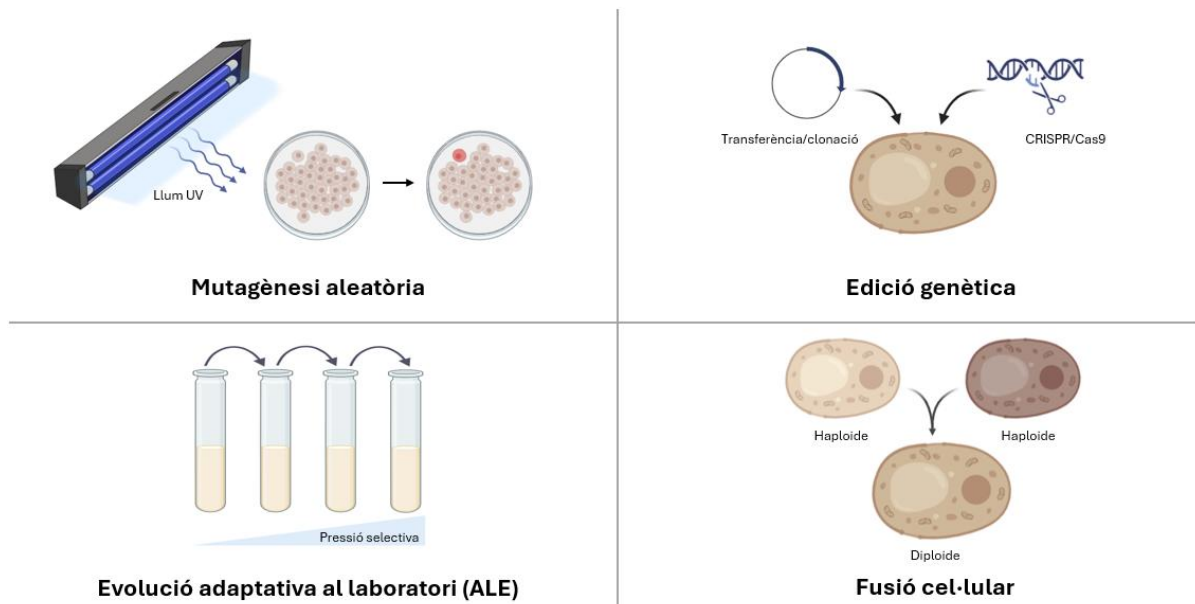


Figura 4. Principals mètodes utilitzats per obtenir soques de llevats millorades amb diferents característiques d'interès. Creat amb BioRender.

1.5.1. Mutagènesi aleatòria

Aquest mètode consisteix a induir mutacions a l'atzar al llarg del genoma utilitzant agents físics o químics que poden causar mutacions puntuals, insercions, delecions o canvis en l'estructura de l'ADN. Tot i que aquestes mutacions poden tenir efectes letals, sovint també generen noves variacions genètiques que donen lloc a fenotips amb les característiques desitjades.

Entre els agents físics el més comú és la radiació ultraviolada (UV), que indueix la formació de dímers de timina (T-T). Es formen enllaços covalents entre dues bases consecutives, que distorsionen l'hèlix d'ADN i alteren el procés de replicació cel·lular. Si no són reparats adequadament, acaben donant lloc a mutacions puntuals o delecions, que alteren de forma permanent la seqüència de gens i la funció de les proteïnes corresponents.

Dins el grup d'agents químics hi ha compostos anàlegs de bases com el 5-bromouracil, que té una estructura similar a la de la timina, però en lloc d'aparellar-se amb l'adenina durant la replicació, ho fa amb la guanina. Al seu torn, la guanina s'aparellarà amb una citosina, produint una transició permanent d'AT a GC. També hi

ha agents alquilants com l'etil metà sulfonat (EMS), que introdueix un grup metil a la guanina provocant un aparellament incorrecte durant la replicació i una transició de GC a AT. Un altre tipus són els agents desaminants, com l'àcid nitrós, que elimina el grup amino de l'adenina i citosina provocant un canvi de base a hipoxantina i uracil, respectivament. Per altra banda, els agents intercalants, com el bromur d'etidi (BrEt), poden inserir-se entre les bases de l'ADN distorsionant la doble hèlix i impedit la replicació normal. Aquesta distorsió pot causar insercions o delecions de bases en la cadena d'ADN que desplacen la pauta de lectura (mutacions *frameshift*). Finalment, els agents oxidants, com el peròxid d'hidrogen, generen ROS que poden danyar l'ADN, ja sigui provocant ruptures de les cadenes d'ADN o modificacions en les bases nitrogenades, que també deriven en mutacions si no es reparen correctament.

La mutagènesi aleatòria permet generar una gran diversitat genètica en poc temps i destaca per la seva simplicitat, baix cost i aplicabilitat en organismes amb eines genètiques limitades. No obstant això, presenta limitacions importants com el caràcter aleatori de les mutacions i la possibilitat de generar canvis no desitjats en gens essencials, fet que sovint es tradueix en una elevada mortalitat cel·lular. A més, requereix cribratges extensos per tal d'identificar els fenotips d'interès.

1.5.2. Evolució adaptativa en laboratori

L'evolució adaptativa al laboratori (ALE) és un mètode que imita el procés natural de selecció evolutiva. Consisteix a exposar de manera progressiva els llevats a condicions ambientals cada vegada més extremes, forçant l'aparició espontània i la selecció de mutants més robustos. Els factors d'estrès poden ser molt variats, com una concentració creixent d'un inhibidor o tòxic, una font de carboni o nitrogen limitada o condicions físiques extremes (Yu Zhao et al. 2022).

En condicions d'estrès, els microorganismes pateixen mutacions espontànies que, en cas que augmentin la capacitat de supervivència o reproducció, seran seleccionades positivament. Les mutacions es van acumulant al llarg de múltiples generacions i, al llarg del temps, les soques millor adaptades a les condicions imposades tendeixen a dominar la població.

El principal avantatge d'aquest mètode és que permet obtenir soques amb característiques millorades i molt ben adaptades a condicions específiques sense

modificar directament el genoma amb tècniques invasives. Com a contrapartida, es tracta d'un procés lent, sovint no predictable, i pot requerir nombrosos cicles de cultiu abans d'obtenir resultats estables i significatius.

1.5.3. Enginyeria genètica

L'enginyeria genètica engloba un conjunt de tècniques que permeten modificar l'ADN d'un organisme de manera precisa. Entre aquestes destaca la clonació, que consisteix a introduir còpies extra d'un gen per potenciar característiques pròpies del llevat, o la transferència de gens, que permet introduir gens exògens d'altres espècies perquè el llevat adquireixi noves capacitats metabòliques. La més avançada és l'edició genètica, especialment mitjançant CRISPR-Cas9, que permet modificar gens específics amb gran precisió. Aquesta tècnica funciona com unes "tisores moleculars" que permeten tallar l'ADN en regions concretes per afegir, eliminar o modificar seqüències per tal d'obtenir organismes amb característiques específiques.

Aquestes eines permeten dissenyar llevats amb gairebé qualsevol característica desitjada, però els organismes resultants són classificats com a GMO (*Genetically Modified Organism*). Aquesta consideració representa una limitació rellevant, atesa l'existent preocupació sobre els possibles impactes d'aquests organismes en el medi ambient i en la salut humana. En conseqüència, afronten importants barreres legals, burocràtiques i econòmiques per a la seva aplicació industrial. Addicionalment, es tracta d'una tècnica complexa que requereix eines moleculars ben desenvolupades i un coneixement detallat del genoma.

1.5.4. Hibridació sexual o fusió cel·lular

En alguns casos, es poden utilitzar tècniques d'hibridació sexual o fusió cel·lular per combinar els genomes de dues soques haploides diferents. Aquest procés implica la fusió de les membranes cel·lulars de dues cèl·lules, seguit de la fusió dels seus nuclis, donant com a resultat una cèl·lula diploide que conté la informació genètica de les dues originals. En el cas dels llevats com *R. toruloides*, la fusió de cèl·lules haploides compatibles es produeix normalment en condicions nutricionals desfavorables. També es pot induir de manera artificial mitjançant l'ús d'agents fusogènics o mitjançant tècniques com l'electrofusió.

Aquesta tècnica permet combinar de manera natural les característiques de dues soques parentals, creant així organismes amb propietats millorades (l'anomenat efecte sinèrgic) o amb múltiples característiques d'interès. No obstant això, presenta limitacions importants: el procés de selecció i estabilització de les soques híbrides pot ser llarg, laboriós i de resultat incert, i sovint no es pot controlar amb precisió quins trets es mantenen, es perden o es combinen. A més, aquesta estratègia no permet incorporar característiques noves que no estiguin ja presents en les soques d'origen, per la qual cosa té un potencial innovador limitat.

1.6. Optimització de llevats i fongs

Tot i el gran ventall d'aproximacions plantejades per a la millora genètica de llevats, el present treball s'enfoca en l'ús de metodologies no transgèniques, especialment la mutagènesi aleatòria i l'ALE. Aquestes tècniques resulten especialment atractives per desenvolupar soques millorades sense comprometre l'estatus GRAS de *R. toruloides*, que facilita la seva implementació industrial. Queden descartades les tècniques com l'edició genètica dirigida, per la seva implicació reguladora, i la fusió cel·lular, per la seva limitada capacitat d'innovació fenotípica i la seva menor compatibilitat amb sistemes diploides estables.

Des d'aquest enfocament, s'han analitzat els mètodes de mutagènesi més comuns en altres llevats no convencionals diploides, com *Candida albicans* i *Pichia pastoris* i en fongs filamentosos, com *Mortierella alpina*.

El llevat *Candida albicans* no disposa d'un cicle sexual conegut que permeti obtenir individus haploides, fet que complica la detecció i l'aïllament de mutants, que sovint són heterozigots recessius. Tot i que els primers estudis als anys 80 empraven mètodes de mutagènesi aleatòria com l'exposició a radiació UV (Poulter i Rikkerink 1983), actualment en aquesta espècie predomina l'ús de mutagènesi dirigida, mitjançant sistemes com UAU1, que permeten obtenir *knockouts* homozigots de manera eficient. Aquesta estratègia és especialment adequada en aquest organisme, ja que es tracta d'una espècie patogènica i els estudis se centren en l'anàlisi funcional del genoma i dels factors de virulència, més que no pas en la seva explotació industrial (Uthayakumar et al. 2021).

Pel que fa a *Pichia pastoris*, es tracta d'un llevat molt utilitzat com a sistema d'expressió en biotecnologia industrial, especialment per a la producció de proteïnes heteròlogues. La millora de soques en aquesta espècie s'ha abordat tradicionalment a través d'estratègies no dirigides com la mutagènesi aleatòria o la metodologia ALE. Aquesta última és recurrent en diversos estudis, per exemple, Moser et al. (2017) la van utilitzar per seleccionar soques amb millor tolerància a metanol, major creixement i major productivitat en condicions industrials. També s'ha fet servir enginyeria genètica dirigida mitjançant la integració estable de còpies del gen d'interès en el genoma, sovint en múltiples còpies per maximitzar la producció proteica (Cregg et al. 2000). Amb el temps, s'han acabat incorporant sistemes CRISPR/Cas9 que faciliten la modificació de rutes metabòliques o l'eliminació de gens competidors (Weninger et al. 2016).

Per acabar, *Mortierella alpina* és un fong filamentós oleaginós àmpliament utilitzat en biotecnologia per a la producció d'AG poliinsaturats (PUFAs), especialment àcid araquidònic (ARA), un compost d'interès nutricional i farmacèutic (Chang et al. 2022). Aquesta espècie pot acumular fins al 50% del CDW en lípids i s'ha convertit en un model consolidat per a l'estudi i optimització de la producció lipídica mitjançant fonts renovables. Per millorar la seva productivitat, s'han aplicat tant estratègies de mutagènesi aleatòria (amb radiació UV o agents químics com l'EMS) com ALE sota condicions d'estrès o en medis amb fonts de carboni alternatives. Aquestes aproximacions han estat utilitzades amb èxit en diverses ocasions per seleccionar soques amb millor rendiment lipídic, tolerància a substrats tòxics o millor assimilació de substrats complexos. Per exemple, recentment, Alhattab et al. (2025) van aconseguir duplicar la producció d'ARA en aquest fong usant els mutàgens químics 5-fluorouracil i dietil sulfat.

Aquests exemples posen de manifest que, tant en llevats no convencionals com *Pichia pastoris* com en fongs filamentosos com *Mortierella alpina*, les estratègies de mutagènesi aleatòria i evolució adaptativa són eines efectives i compatibles amb aplicacions industrials, especialment quan es vol evitar la generació d'organismes modificats genèticament. Aquest context reforça la idoneïtat d'aquestes aproximacions per a altres microorganismes d'interès biotecnològic, com *R.*

toruloides, que, tot i ser un llevat, presenta certes característiques fisiològiques i metabòliques similars a les dels fongs filamentosos.

1.7. Soques millorades de *R. toruloides*

Tot i que algunes soques salvatges de *R. toruloides* presenten una elevada capacitat de producció i acumulació de lípids i carotens, sovint mostren un rendiment i una productivitat baixos en entorns industrials. Sorgeix un interès per modificar les característiques que resulten poc adequades per a la producció a gran escala, amb l'objectiu principal d'augmentar la producció cel·lular i tolerància als compostos inhibidors presents en els medis de cultiu.

La mutagènesi amb radiació UV ha estat una tècnica recurrent en aquesta espècie. Yamada et al. (2017) la van utilitzar en la soca 8766 3-11C per obtenir el mutant 2-53C que presenta una capacitat d'assimilació de xilosa i una productivitat lipídica superior a la de la soca parental. En un altre estudi, es va combinar radiació UV amb agents químics com la nitrosoguanidina (NTG), obtenint el mutant U13N3 amb canvis visibles en la coloració. Aquest mutant va passar de color taronja-vermell a groc pàl·lid i va acumular fins a un 74,3% CDW de lípids (Yihan Zhao et al. 2021).

També s'han explorat tècniques alternatives com l'ús de plasma atmosfèric a temperatura ambient (ARTP), una font d'ions reactius que pot provocar trencaments en la doble hèlix d'ADN. Aquest mètode físic ha permès obtenir diversos mutants amb una resistència millorada al compost inhibidor 5-HMF (Qi et al. 2014). A més, la combinació d'ARTP i NTG també ha resultat eficaç: el mutant XR-2, obtingut a partir de la soca parental NP11, va formar colònies de color vermell fosc i va mostrar una acumulació intracel·lular significativament superior de lípids i carotenoides (C. Zhang et al. 2016).

En general, tots aquests mètodes són efectius per obtenir mutants, però mostren taxes de supervivència cel·lular extremadament baixes, la qual cosa indica l'ús de protocols molt agressius amb una afectació extensa del genoma. Els mètodes en què s'utilitza la radiació UV descriuen una supervivència del 10% (Yamada et al. 2017), mentre que els que fan servir l'ARTP tenen valors de supervivència d'entre l'1% i el 5%, que es veuen encara més reduïts al combinar amb NTG (C. Zhang et al. 2016; Yamada et al. 2017; Qi et al. 2014).

Aquest grau tan elevat de mortalitat no només redueix l'eficiència del procés, sinó que suggereix una afectació indiscriminada de múltiples gens, dificultant la interpretació funcional dels mutants i augmentant el risc de perdre característiques cel·lulars desitjables. En aquest context, es fa evident la necessitat d'aplicar un protocol de mutagènesi menys agressiu, que redueixi l'impacte global sobre el genoma i permeti focalitzar la selecció en mutacions puntuals o específiques que afectin rutes d'interès concretes.

2. HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS

R. toruloides destaca per la seva capacitat de biotransformar sucres lliures presents en hidrolitzats vegetals en lípids i carotenoides. Tot i això, la seva sensibilitat al furfural i 5-HMF, derivats del pretractament de la biomassa, dificulta l'aplicació directa sobre els hidrolitzats, que han de ser prèviament desintoxicats per eliminar aquests compostos inhibidors. Això comporta un increment de costos i de temps de processament, que en conjunt limiten el rendiment global. En aquest context, sorgeix interès per obtenir soques de *R. toruloides* més resistents als inhibidors, capaces d'aprofitar directament els hidrolitzats sense tractaments previs, afavorint processos més simples i econòmics.

Hipòtesi

L'aplicació de metodologies no transgèniques com la mutagènesi aleatòria, combinada amb la metodologia ALE, permet obtenir mutants del llevat *R. toruloides* superresistents als inhibidors presents als hidrolitzats vegetals.

Objectius

Es planteja com a objectiu principal del treball obtenir mutants de *R. toruloides* amb una capacitat millorada per a la biotransformació d'hidrolitzat de biomassa vegetal. A partir d'aquest objectiu, sorgeixen els següents objectius específics:

1. Dissenyar un protocol de mutagènesi amb valors de mortalitat variables i reproduïbles que permeti obtenir soques d'ús en contextos industrials no transgènics.
2. Obtenir, identificar, aïllar i caracteritzar mutants amb major tolerància als inhibidors presents als hidrolitzats vegetals, així com mutants amb altres possibles fenotips d'interès.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Llevat, medis i condicions de cultiu

En aquest estudi es va utilitzar la soca de *Rhodotorula toruloides* CECT1499, diploide i protòtrofa. Els llevats van ser cultivats en el medi complet YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*), que conté extracte de llevat 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L a pH 5,0, i en medi mínim YNB (*Yeast Nitrogen Base*) a una concentració de 3,5 g/L, suplementat amb glucosa 20 g/L i ajustat a pH 6,5.

Els cultius líquids es van incubar en ampolles roscades amb medi YPD a 28 °C i amb agitació a 120 rpm. Els cultius en medi sòlid es van realitzar en plaques d'agar YPD o YNB i es van incubar a 28 °C.

3.2. Mutagènesi

Per als tractaments de mutagènesi es van utilitzar 1×10^8 cèl·lules en fase estacionària o en fase exponencial (obtingudes inoculant 100 µL de cultiu en 900 µL de medi fresc 4 h abans del tractament). Els llevats van ser sotmesos a mutagènesi física amb radiació UV (302 nm-12 W) o química amb BrEt (5 mL) durant intervals de temps compresos entre 0 i 45 min. Després de l'exposició, les cèl·lules es van rentar amb aigua estèril i es van sembrar en placa amb medi YPD per avaluar la viabilitat relativa mitjançant el recompte de colònies viables (UFC). Les cèl·lules tractades amb radiació UV es van deixar recuperar durant 4 h en un bany a 30 °C després de l'exposició.

3.3. Adaptació evolutiva al laboratori

Les cèl·lules mutagenitzades es van cultivar en medi líquid amb concentracions creixents de furfural i 5-HMF fins arribar a 0,82 g/L i 0,4 g/L, respectivament. Cada 48 h es transferien 100 µL de cultiu a 20 mL de medi amb concentració superior d'inhibidor, utilitzant la terbolesa com a indicador de creixement. Quan ja no es va detectar creixement després de 48 h, es va considerar assolit el límit de tolerància.

Els mutants seleccionats mitjançant aquest procés van ser avaluats en agar YPD amb inhibidor (0,82 g/L furfural i 0,4 g/L 5-HMF) per identificar els que presentaven un creixement més robust en presència de pressió selectiva. A partir d'aquests, es van recuperar colònies aïllades, que van ser replicades 3 vegades en plaques amb medi

selectiu i una en medi YPD sense suplementar. Després es van realitzar cultius líquids amb inhibidor durant 48 h. Finalment, es va fer una avaluació qualitativa del grau de resistència dels mutants mitjançant un test de degoteig en plaques de YPD amb inhibidor, que van ser incubades a 28 °C durant 48 h. Prèviament, es va ajustar la densitat òptica (DO) de tots els cultius líquids, que van ser diluïts fins a $1 \cdot 10^8$ cèl·lules/mL.

3.4. Avaluació del creixement dels mutants

Els mutants aïllats van ser precultivats durant 24 h per sincronitzar l'estat fisiològic de les cèl·lules i després es va ajustar la DO de tots els cultius a 0,3. De cada mutant es van fer dos cultius en medi YPD, un d'ells amb suplementació d'inhibidor (0,82 g/L de furfural i 0,4 g/L de HMF), durant 41 h. Es van anar prenent alíquotes cada 6 h per mesurar la DO i determinar el patró de creixement en cada condició.

3.5. Avaluació de fenotips d'interès

Per identificar mutants amb altres fenotips d'interès es va realitzar una selecció fenotípica en placa. Aproximadament 18.000 colònies van ser avaluades en medi complet, i es van aïllar aquelles amb variacions de color. Paral·lelament, uns 12.000 mutants van ser cultivats en medi complet i copiats mitjançant la tècnica de *replica plate* en medi mínim per detectar auxòtrofs.

3.6. Validació microscòpica dels mutants

Les cèl·lules en fase estacionària van ser suplementades amb glucosa al 5% per afavorir una baixa relació N/C i promoure l'acumulació de lípids. Els cultius líquids es van tenyir amb el fluorocrom Bodipy 493/503 (ThermoFisher) a una concentració final de 0,5 μ M per 1×10^{10} cèl·lules, incubant durant 30 min a 37 °C. Les cèl·lules es van centrifugar durant 5 min a 37 °C i es van rentar amb PBS dues vegades. Finalment, van ser visualitzades al microscopi òptic invertit *làser scanning confocal Nikon TE 2000* per validar la identitat i avaluar la capacitat d'acumulació de lípids dels mutants.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Mutagènesi de *R. toruloides*

R. toruloides va ser tractat amb BrEt i radiació UV en dos estadis fisiològics diferenciats. Es va treballar amb cèl·lules a l'inici de la fase exponencial, una o dues divisions després de la sortida de la fase de latència, i amb cèl·lules en fase estacionària, a les 48 h de cultiu. Per avaluar l'efecte de cada tractament en funció de l'estat fisiològic es va quantificar la viabilitat cel·lular relativa (Figura 5).

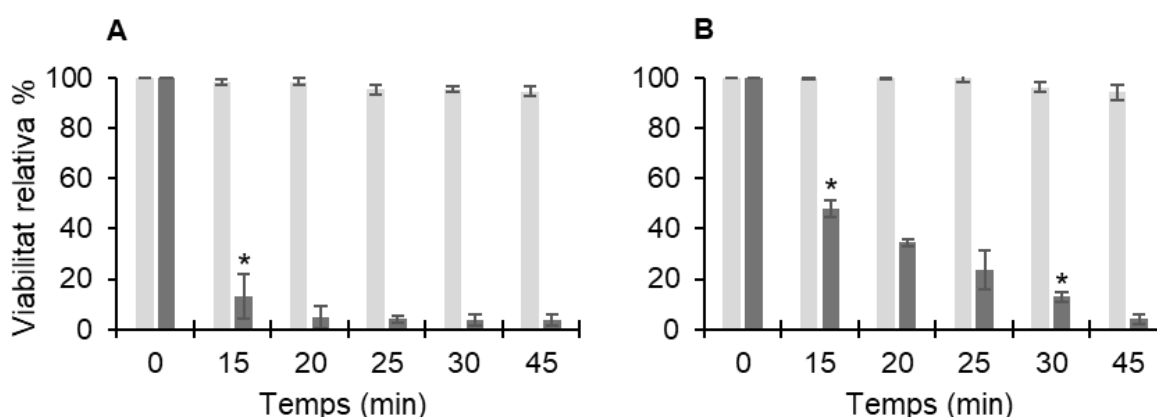


Figura 5. Mutagènesi de *R. toruloides*. Viabilitat cel·lular relativa després de tractar $1 \cdot 10^8$ cèl·lules (100%) amb 5 ml de bromur d'etidi (BrEt), (A), o amb radiació UV 302 nm-12 W, (B), en diferents temps. Les barres gris clar es corresponen a cèl·lules en fase estacionària ($n=3$ BrEt i $n=4$ UV) i les gris fosc a cèl·lules en fase exponencial ($n=3$). Els valors mostrats són mitjanes de n repeticions independents \pm desviació estàndard. * p -valor <0.05 respecte al temps precedent.

En tractar les cèl·lules en fase estacionària amb BrEt, la viabilitat cel·lular es va mantenir constant al voltant del 100% i no es va observar cap disminució significativa al llarg del temps. Per contra, l'aplicació del mateix tractament a cèl·lules en fase exponencial va provocar una reducció significativa de la viabilitat al cap de 15 min, amb valors entorn del 10%. En els temps posteriors la viabilitat va continuar disminuint lleugerament, amb valors al voltant del 5%, però aquestes diferències no van resultar significatives respecte al valor previ, probablement a causa de l'elevada mortalitat cel·lular ja assolida en el primer punt.

Pel que fa al tractament de les cèl·lules en fase estacionària amb radiació UV, tampoc es van detectar canvis significatius en la viabilitat cel·lular: aquesta es va mantenir per sobre del 90% en tots els temps d'exposició. En canvi, en les cèl·lules en fase exponencial, es va observar una disminució progressiva de la viabilitat amb diferències significatives als 15 i 30 min respecte als temps anteriors. Aquests temps

representen els punts crítics amb major afectació respecte el temps precedent. En concret, al cap de 15 min la viabilitat es va reduir fins a valors propers al 50% i 30 min després fins prop del 10%. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts per Yamada et al. (2017), que van observar una supervivència del 10% després d'exposar *R. toruloides*, juntament amb altres llevats oleaginosos, a una font de radiació UV de 2 W/m² durant menys de 4 min (200 segons).

En conjunt, els resultats indiquen que ambdós tractaments redueixen de manera significativa la viabilitat cel·lular en cèl·lules en fase exponencial, mentre que en cèl·lules en fase estacionària es manté una viabilitat pràcticament inalterada independentment del temps d'exposició. La pèrdua de viabilitat observada amb BrEt és molt més abrupta que amb la radiació UV, la qual mostra una reducció més progressiva. Aquestes diferències poden ser degudes al diferent mecanisme d'acció d'aquests agents: la radiació UV causa dímers de timina, activant mecanismes de reparació de l'ADN, mentre que el BrEt s'intercala en l'ADN, bloquejant la transcripció i replicació de manera més directa.

De forma general, les cèl·lules en fase estacionària són més resistents als diferents tractaments que les cèl·lules en divisió, ja que es troben, per definició, en un estat de resposta a l'estrès, amb gran acumulació de metabòlits secundaris que tenen una funció protectora. En el cas de *R. toruloides*, capaç d'acumular entre 1 i 10 mg/g CDW de β -carotè, torulè i torularodina (Szotkowski et al. 2023; Qi et al. 2020), s'observa una resistència excepcionalment elevada, probablement relacionada amb l'acumulació de carotenoides i el seu efecte protector davant la radiació UV.

Pel que fa al BrEt, s'ha descrit que pot induir estrès cel·lular, contribuint a l'acumulació de ROS i causant danys oxidatius en determinades condicions (Nacarelli, Azar, i Sell 2014). En aquest context, la presència de carotenoides podria suposar un mecanisme de protecció gràcies a la seva capacitat antioxidant, reduint l'impacte d'aquest compost. No obstant això, la viabilitat cel·lular tan elevada observada en fase estacionària suggereix que aquest mecanisme no seria l'únic responsable de la resistència al BrEt. Caldria considerar la possible implicació de mecanismes addicionals de tolerància propis de l'estat estacionari, com l'activació de transportadors o altres sistemes de desintoxicació, que afavoreixin l'expulsió del BrEt o en limitin l'accés a l'ADN.

Quant a les cèl·lules en fase exponencial, hi ha estudis que indiquen que el contingut de carotenoides en aquesta fase és negligible, ja que la síntesi comença de manera significativa a la fase estacionària (Singh et al. 2016). Aquest fet s'ha pogut corroborar també al laboratori, ja que les cèl·lules en fase exponencial presenten una coloració blanca o una lleugera pigmentació, mentre que les cèl·lules adultes adquireixen una coloració taronja intensa a partir de les 48 h de cultiu. Aquest fet podria explicar la susceptibilitat més gran que presenta aquest grup als diferents tractaments, sobretot a la radiació UV.

Tenint en compte els resultats obtinguts, es va descartar l'ús de cèl·lules en fase estacionària com a material de partida per a la mutagènesi, atès que cap dels dos tractaments va produir una disminució significativa de la viabilitat, suggerint una baixa taxa de mutagènesi i, per tant, una capacitat limitada per generar variabilitat genètica. D'altra banda, també es va descartar l'ús del BrEt com a agent mutagènic a causa de la seva elevada toxicitat, que implica una afectació indiscriminada de gran quantitat de gens i vies metabòliques. Així doncs, en les etapes posteriors es va continuar treballant amb cèl·lules tractades en fase exponencial amb radiació UV. Concretament, es van considerar òptims els temps d'exposició de 15 i 30 min, ja que corresponen a una viabilitat del 50 % i del 10 %, respectivament, i, per tant, podrien estar generant mutants amb un grau d'afectació genòmica diferent.

4.2. Adaptació evolutiva de *R. toruloides* resistent a inhibidors d'hidrolitzats lignocel·lul·lòsics

Després del tractament mutagènic amb radiació UV, les cèl·lules van ser sotmeses a un procés d'ALE mitjançant cultius líquids successius en presència d'inhibidors lignocel·lul·lòsics en concentracions creixents. Aquest procés va permetre seleccionar progressivament les poblacions amb major tolerància. A partir d'aquestes, es van aïllar colònies individuals amb un creixement aparentment superior en medi selectiu.

Per avaluar de forma qualitativa el fenotip de resistència, es va dur a terme un test de degoteig en placa suplementada amb inhibidor, on es va comparar el creixement dels mutants amb el de la soca de referència (*Figura 6*).

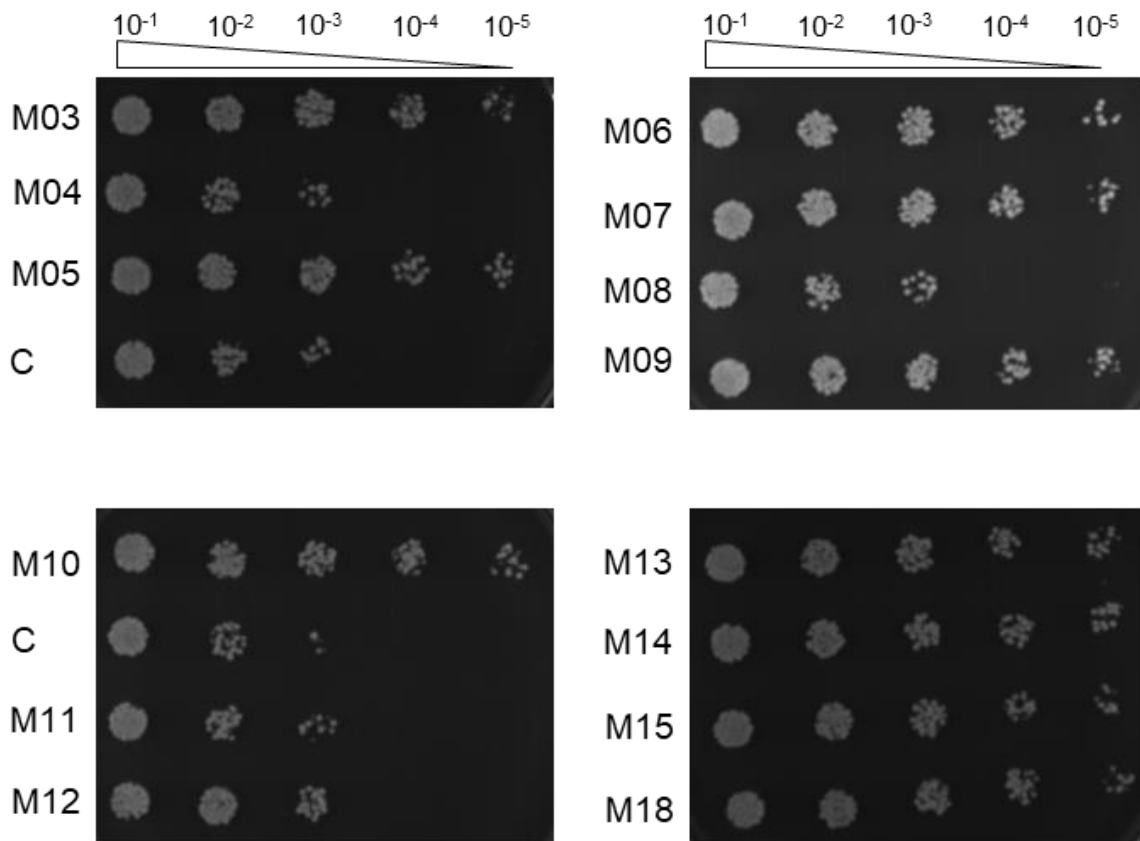


Figura 6. Test per degoteig. Avaluació dels mutants de resistència als inhibidors d'hidrolitzat vegetal. Els mutants resistents van ser aïllats i gotejats en plaques de YPD suplementades amb 0,82 g/L furfural i 0,4 g/L hidroximetil furfural (HMF), que van ser incubades a 28 °C durant 48 h. Prèviament, es va ajustar la densitat òptica (DO) de tots els cultius líquids, que van ser diluïts fins a $1 \cdot 10^8$ cèl·lules/mL. En total, 25 mutants amb major creixement que el control en presència d'inhibidor van ser aïllats. A títol d'exemple es mostra el creixement per la soca de referència (C) i 14 mutants (M) que mostren fenotips amb diferent grau de resistència als inhibidors.

En presència d'inhibidors d'hidrolitzat vegetal, la soca control (C) presenta un creixement molt limitat, indicant una escassa tolerància a aquests. El creixement és només visible a les dilucions més concentrades, on la quantitat d'inhibidor per cèl·lula es redueix per efecte de dilució permetent un creixement mínim.

Pel que fa als 14 mutants analitzats, 10 (M03, M05, M06, M07, M09, M10, M12, M14, M15 i M18) mantenen un creixement clarament superior al de la soca de referència, especialment en dilucions on aquesta ja no sobreviu, confirmant l'existència d'un fenotip resistent i estable en absència de la pressió selectiva. En aquests mutants s'observa certa variabilitat en el grau de resistència, ja que alguns creixen més que altres a dilucions elevades. Aquesta heterogeneïtat suggereix que les mutacions responsables del fenotip observat poden ser resultat de mutacions diverses que donen lloc a diferents mecanismes de tolerància, sent alguns d'ells més eficients.

En contrast, quatre mutants (M04, M08, M11 i M13) mostren un creixement similar al de la soca control, la qual cosa suggereix una pèrdua del fenotip resistent i una manca d'estabilitat genètica. Aquesta pèrdua de fenotip ja ha estat descrita en estudis previs. Per exemple, Marr et al. (2018) van treballar amb soques de *Candida albicans* resistents al fluconazol, que en ser cultivades en un medi lliure d'azol perdien el fenotip resistent, mostrant-se més vulnerables en futures exposicions.

Així, el procés d'ALE va permetre aïllar diversos mutants amb un fenotip aparent de resistència als inhibidors lignocel·lulòsics. Tanmateix, es va observar que no tots aquests fenotips es mantenen estables al llarg del temps, especialment quan la pressió selectiva deixa d'estar present. En aquest context, el test de degoteig ens permet discriminar entre fenotips estables i inestables, així com seleccionar aquells que mantenen la resistència en absència de la pressió selectiva.

4.3. Avaluació del creixement dels mutants resistents

En un context industrial, és important que les soques utilitzades presentin resistència als inhibidors, però també és fonamental que mantinguin una taxa de creixement elevada, per evitar comprometre l'eficiència del procés biotecnològic. Per aquesta raó, es va analitzar el creixement en medi líquid d'alguns exemplars per comparar-los amb el de la soca control. En concret, es van avaluar els mutants M03 i M06, que mostren un fenotip clar de resistència, i de M04, que representa un cas de possible pèrdua del fenotip resistent (*Figura 7*).

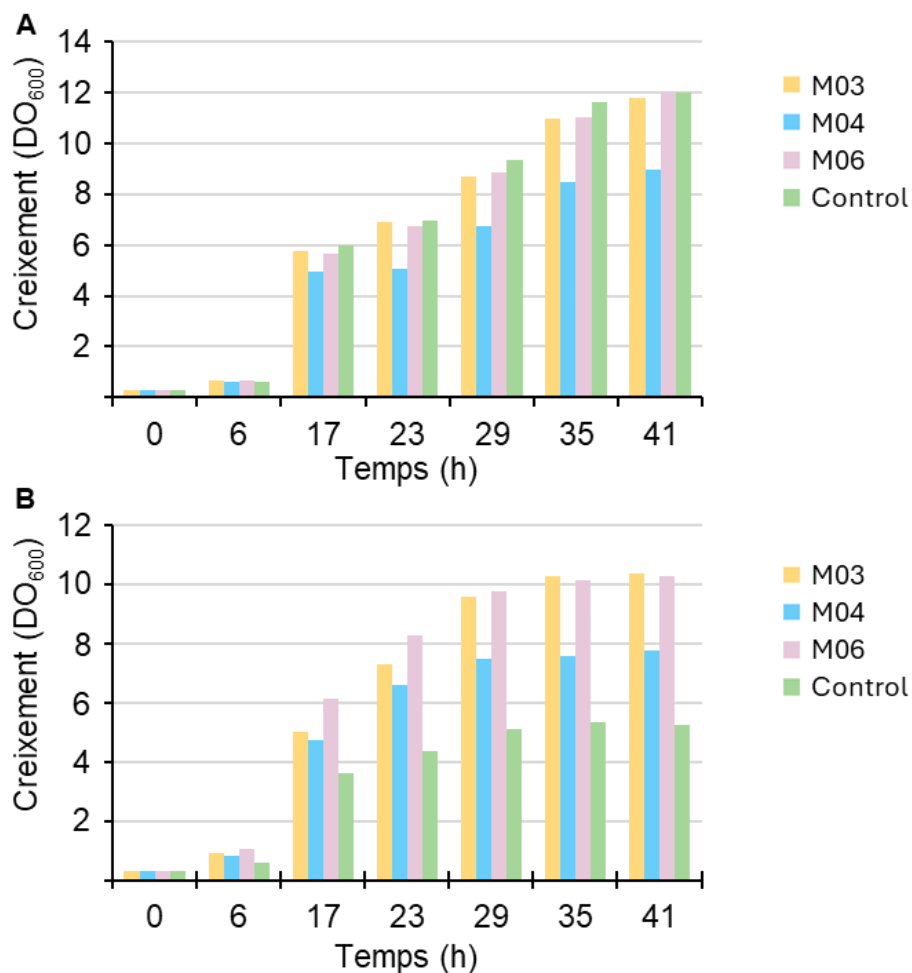


Figura 7. Corbes de creixement dels mutants M03, M04, M06 i Control en YPD, (A), i YPD suplementat amb 0,82 g·L⁻¹ furfural i 0,4 g·L⁻¹ HMF, (B), incubats a 28 °C i 120 rpm. Els valors mostrats són mitjanes de 2 repeticions independents.

En condicions no restrictives, els mutants M03 i M06 mostren un patró de creixement gairebé idèntic al de la soca control, assolint valors similars de densitat òptica (DO) al final del cultiu. Aquest resultat indica que les alteracions produïdes en aquests mutants no afecten negativament el seu creixement en condicions no selectives. En canvi, el mutant M04 presenta un creixement inferior, que es fa evident a partir de les 17 h, assolint una DO final clarament per sota de la resta. Aquest comportament suggereix que aquest mutant té una afectació directa en mecanismes relacionats amb la replicació i divisió cel·lular o creixement.

En presència d'inhibidor, la soca control experimenta una clara reducció del creixement respecte a la condició no restrictiva, amb una DO final aproximadament un 50% inferior, evidenciant la seva alta sensibilitat als inhibidors presents al medi. Els mutants M03 i M06, en canvi, mostren una capacitat de creixement

substancialment superior a la del control en aquestes condicions, tot i que també pateixen una certa reducció respecte al seu propi creixement sense inhibidor. Aquests resultats confirmen que M03 i M06 conserven el fenotip de resistència, i, que tot i que els inhibidors tenen un cert impacte, la seva tolerància és considerablement superior. Aquesta observació és coherent amb els resultats obtinguts en el test per degoteig, on M03 i M06 també mostraven un fenotip més potent que el control i que M04.

Quant a M04, sembla ser el menys afectat per la presència d'inhibidor en termes relatius, ja que la seva DO final varia menys que en la resta respecte a la condició sense inhibidor. Aquest patró podria indicar que, a causa del seu creixement lent, la seva assimilació i exposició efectiva als inhibidors és menor, mostrant una tolerància aparent o falsa resistència. En aquest cas, els resultats també es complementen amb els del test per degoteig, on veiem en M04 un fenotip més dèbil que M03 i M06, però lleugerament més resistent que el control.

Pel que fa a les corbes de creixement, durant les primeres sis hores hi ha un creixement relativament lent i es manté un pendent suau, mentre que a partir d'aquest punt s'evidencia un increment més pronunciat. A primera vista, aquest canvi podria recordar un patró de creixement diàuxic, caracteritzat per dues fases separades per un canvi metabòlic; tanmateix, en aquest cas es tracta d'un llevat sense metabolisme fermentatiu. Així doncs, cal tenir en compte que entre les 6 i 17 h hi ha un interval de mostreig molt més llarg que entre la resta de punts, de manera que l'aparent canvi brusca en el pendent podria deure's simplement a l'absència de dades intermèdies.

De forma més general, s'observa en tots els casos un increment progressiu de la DO fins a assolir la fase estacionària al voltant de les 41 h. Aquesta entrada a la fase estacionària és coherent amb les observacions fetes al laboratori, ja que a les 48 h les cèl·lules adquireixen una tonalitat taronja intensa, indicativa de l'acumulació de carotens, juntament amb altres metabòlits secundaris.

4.4. Colònies de *R. toruloides* amb altres fenotips d'interès

De forma paral·lela al procés de selecció i aïllament de mutants amb major resistència a compostos inhibidors, també es van identificar colònies que presentaven altres fenotips d'interès. Concretament, es va posar el focus en la detecció de mutants auxòtrofs i mutants amb pèrdua de pigmentació. A més, es va observar la presència

de colònies amb capacitat de filamentació reduïda, un tret que, tot i no haver estat caracteritzat en aquest estudi, podria representar un altre fenotip rellevant per a futures aplicacions industrials.

Pel que fa a les auxotròfies, es van aïllar les colònies aparentment incapaces de créixer en medi mínim. En una primera selecció es van obtenir 18 possibles candidats, dels quals únicament un es va confirmar com a mutant auxòtrof estable després de successius cultius en medi complet i rèpliques en medi mínim. Aquest resultat representa una freqüència d'aparició del 0,009% respecte als aproximadament 12.000 mutants avaluats. Tot i que es tracta d'una freqüència baixa, aquest tipus de mutants poden ser útils en estudis de fisiologia, en estratègies de bioseguretat (com a mecanisme de confinament) o com a eina per desenvolupar sistemes de selecció basats en la complementació gènica.

Quant als mutants amb pèrdua de coloració, es van aïllar aquelles colònies que presentaven una pigmentació menys intensa que la soca original, taronja, incloent-hi colònies completament blanques. En total, es van aïllar 18 possibles mutants blancs, que van ser cultivats juntament amb la soca de referència per confirmar el fenotip *white* (Figura 8).

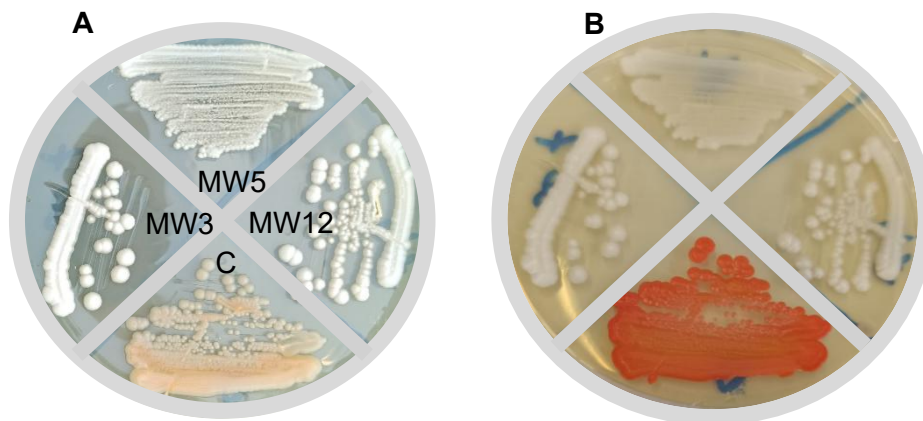


Figura 8. Avaluació dels mutants amb fenotip blanc. Els mutants blancs aïllats van ser replicats 3 vegades en plaques de medi YPD i posteriorment van ser inoculats YPD des d'una colònia aïllada. Es van avaluar al cap de 24h (A) i 72 h (B) de cultiu a 28 °C. Soca de referència (C) i 3 dels mutants blancs (MW).

Al cap de 24 h de cultiu, els mutants *white* mostren colònies de color blanc, mentre que la soca control mostra un color lleugerament ataronjat. Després de tres dies de creixement, es constata una clara diferenciació: mentre que la soca control presenta una coloració taronja intensa deguda a l'acumulació de carotens, els mutants MW

conserven una coloració blanca estable, sense signes visibles de pigmentació. Aquest resultat confirma la presència del fenotip *white* en els mutants seleccionats i la seva persistència després de successius cultius en placa, indicant que la manca de pigmentació no és un tret transitori o associat només a una etapa concreta del creixement sinó que es tracta d'un fenotip estable al llarg del temps.

Tot i que a la imatge només es mostren tres mutants, tots els 18 mutants blancs aïllats van mostrar el mateix comportament en els cultius posteriors, confirmant així el seu fenotip. Tenint en compte que durant la selecció visual es van avaluar aproximadament 18.000 mutants, les alteracions en la pigmentació representen una freqüència d'aparició del 0,1%. Aquest resultat suggereix que les mutacions que afecten la producció de carotenoides també són poc freqüents, tot i que es detecten amb més facilitat que les auxotròfies.

En conjunt, és probable que els fenotips *white* observats siguin resultat de mutacions en gens reguladors de la via biosintètica dels carotenoides, o bé en gens implicats en mecanismes de senyalització que en regulen l'expressió durant la fase estacionària. La falta de pigmentació en aquests mutants pot ser indicativa d'una alteració en el flux metabòlic del carboni, amb un possible guany cap a la síntesi de lípids, per la qual cosa constitueixen una eina d'interès per a futures aplicacions biotecnològiques relacionades amb la producció de lípids.

4.5. Validació microscòpica dels mutants

Per tal de verificar que els llevats seleccionats corresponen efectivament a mutants de *R. toruloides*, es van observar alguns exemplars sota microscòpia òptica en camp clar per comparar-ne la morfologia cel·lular amb la de la soca salvatge. Posteriorment, es van observar mitjançant microscòpia de fluorescència per avaluar la capacitat d'acumulació de lípids (*Figura 9*).

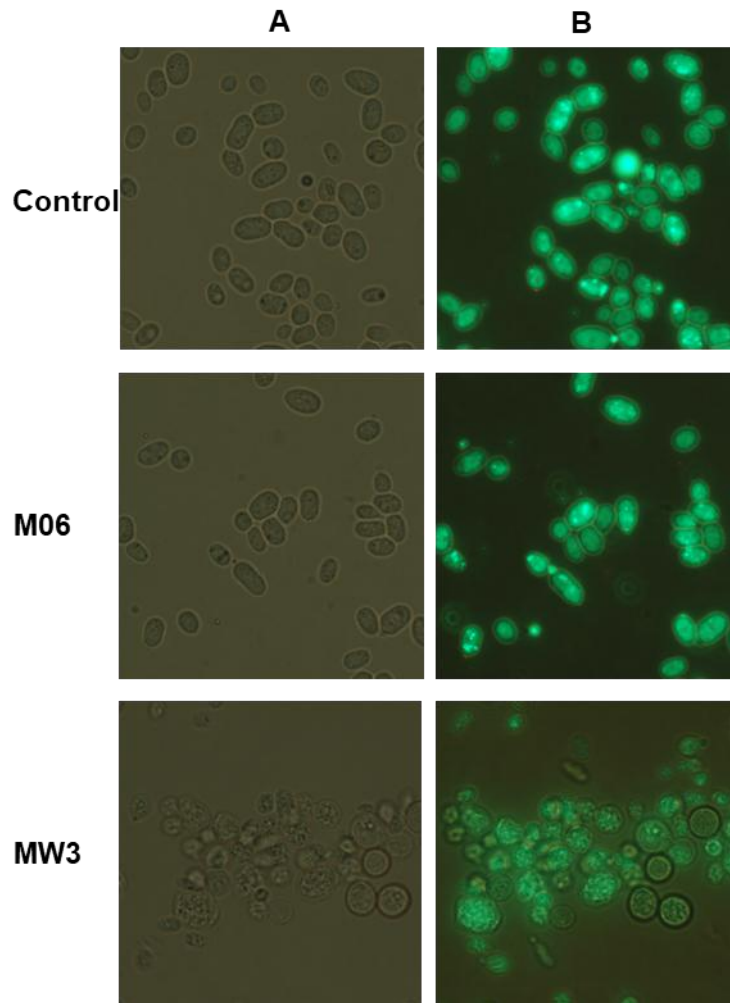


Figura 9. Observació dels mutants amb microscòpia de camp clar (A) i fluorescència (B). La soca control i el mutant blanc MW3 van ser cultivats en YPD i el mutant M06 en YPD amb inhibidor durant 72 h a 28 °C i 120 rpm.

D'acord amb les imatges de microscòpia de camp clar, el mutant M06 presenta una morfologia i mida cel·lular compatibles amb la soca original de *R. toruloides*. Aquesta observació permet descartar amb un alt grau de seguretat la presència de possibles contaminants. Així mateix, es confirma que les modificacions genètiques introduïdes no han alterat l'estructura cel·lular bàsica. Aquesta validació microscòpica es correlaciona amb les dades visuals obtingudes al laboratori, ja que el mutant de resistència també presenta la pigmentació taronja característica de l'espècie.

En el cas del mutant MW3, s'observa un nombre considerable de cèl·lules amb una morfologia més arrodonida i una mida aparentment superior a la de la soca control. Aquestes diferències impedeixen confirmar amb certesa que es tracti de la mateixa espècie mitjançant l'observació microscòpica. A més, altres indicadors habituals com el color de les colònies no són informatius en aquest cas. Tot i això, cal destacar que

MW3 presenta un patró de creixement en placa similar al de la soca control, amb colònies de mida i morfologia similars (*Figura 8*). Davant d'aquestes observacions, no es pot descartar que es tracti d'una soca de *R. toruloides* que hagi patit mutacions que afectin directament la morfologia i volum cel·lulars.

En *S. cerevisiae*, s'han descrit augments del volum cel·lular de fins al 60% durant processos de senescència (Ghanem et al. 2019). És possible, per tant, que en *R. toruloides* aquests trets morfològics també s'associïn a cèl·lules senescentes, suggerint un envelliment cel·lular accelerat en la soca MW3 respecte al control i M06. Aquest envelliment prematur podria deure's a mutacions que afecten de forma directa els processos de senescència, o bé al mateix dèficit de carotenoides, que deixa la cèl·lula desprotegida front l'estrès oxidatiu. Cal destacar, però, que aquesta hipòtesi es basa en analogies amb *S. cerevisiae*, ja que els processos de senescència en *R. toruloides* no estan encara ben caracteritzats. Per tant, serien necessaris estudis addicionals per confirmar si aquests fenotips morfològics responen a una alteració fisiològica pròpia de *R. toruloides*, o si, per contra, podrien indicar la presència d'un contaminant d'una altra espècie.

Quant a les imatges de fluorescència, s'ha utilitzat el fluorocrom Bodipy 493/503 (ThermoFisher) que marca de forma específica els lípids intracel·lulars, permetent visualitzar les vesícules citoplasmàtiques o gotes lipídiques on aquests s'emmagatzemen. Tot i que el senyal fluorescent és variable entre cèl·lules i soques, es confirma la presència de lípids en totes elles, per la qual cosa podem assegurar que tant MW3 com M06 mantenen la capacitat de síntesi i acumulació lipídica. Encara que aquesta observació no constitueix una validació taxonòmica directa, cal tenir en compte que la capacitat d'acumulació lipídica no és comuna en tots els llevats. Per tant, l'acumulació de lípids reforça la hipòtesi que la soca MW3 podria correspondre a un mutant de *R. toruloides*, i no a un microorganisme contaminant.

4.6. Limitacions i futures perspectives

Tot i els resultats obtinguts, aquest estudi presenta diverses limitacions metodològiques i d'interpretació que cal tenir en compte. En primer lloc, els assaigs de viabilitat cel·lular sota tractament amb BrEt i radiació UV mostren diferències clares entre fases de creixement, amb una major resistència en fase estacionària. Tanmateix, aquests resultats no permeten determinar amb precisió quin és el

mecanisme molecular responsable d'aquesta resistència. La principal hipòtesi plantejada és que l'acumulació de carotenoides podria conferir una protecció davant d'aquests agents. En un futur, seria interessant repetir els assaigs en mutants deficients en la síntesi de carotens, per tal de validar si la manca d'aquests pigments incrementa la sensibilitat al BrEt i a la radiació UV.

Pel que fa al test de degoteig utilitzat per avaluar la resistència als compostos lignocel·lulòsics, es tracta d'una tècnica molt visual, però no proporciona dades quantitatives que permetin fer una comparació precisa entre soques. Per aquest motiu, els resultats s'han complementat amb corbes de creixement en medi líquid en presència d'inhibidor, tot i que, per qüestions de temps, només s'han pogut realitzar en tres soques representatives. En futurs estudis, caldria caracteritzar totes les soques resistents aïllades per disposar de dades més robustes i comparables. A més, existeix un salt temporal entre les 6 i les 17 h en les corbes de creixement, període en què es produeix un canvi sobtat en el pendent. Per poder discernir si es tracta d'un patró de creixement real o bé d'un efecte associat a l'escassetat de punts intermedis, seria convenient augmentar la densitat de mostreig en aquest interval.

D'altra banda, tot i que s'han obtingut mutants amb diferents fenotips d'interès (com resistència a compostos lignocel·lulòsics, auxotròfies o absència de pigmentació), no s'ha determinat quines mutacions específiques en són responsables. En aquest sentit, seria rellevant dur a terme anàlisis moleculars que permetin identificar les regions genòmiques alterades i validar si estan implicades en vies de resposta a estrès, resistència als inhibidors, síntesi de carotens, etc.

Pel que fa a la microscòpia òptica, aquesta ha permès avaluar la morfologia cel·lular i fer una primera validació de la identitat dels mutants M06 i MW3. Tot i això, seria necessari fer una segona validació molecular, especialment en el cas del mutant MW3, que no s'ha pogut confirmar a nivell microscòpic que es tracti d'una soca *R. toruloides*. Es podrien seqüenciar regions úniques del genoma d'aquesta espècie, com ara els gens de la via dels carotens o el *locus* de *mating type*, que és específic d'aquest llevat.

Finalment, la microscòpia de fluorescència ha permès confirmar la presència de lípids en totes les soques analitzades. Tot i això, la intensitat del senyal ha estat variable i

proporciona dades qualitatives, per la qual cosa seria interessant complementar aquesta tècnica amb citometria de flux per poder quantificar l'acumulació lipídica. Addicionalment, l'ús de citòmetres *cell sorter* obriria la possibilitat d'aïllar les cèl·lules amb major acumulació de lípids i regenerar-ne una població enriquida. També resultaria especialment interessant explorar la creació d'híbrids entre segregats amb fenotips *white* i mutants superresistents als inhibidors presents als hidrolitzats vegetals.

En conjunt, aquests resultats obren múltiples vies per a estudis futurs orientats a entendre millor les bases moleculars dels fenotips observats i aprofitar el potencial de *R. toruloides* com a plataforma biotecnològica en entorns industrials complexos.

5. CONCLUSIONS

Un cop realitzat el treball, es conclou que l'aplicació de metodologies no transgèniques com la mutagènesi aleatòria, combinada amb la metodologia ALE, permet obtenir mutants de *R. toruloides* superresistents als inhibidors presents als hidrolitzats vegetals. Concretament, s'han aïllat mutants capaços de tolerar concentracions d'inhibidor aproximadament 7 vegades superiors a les que se solen trobar en hidrolitzats vegetals (Monteiro de Oliveira et al. 2021) .

D'una banda, l'avaluació de diferents agents mutagènics i fases fisiològiques en *R. toruloides* ha permès identificar les condicions més adequades per obtenir una mortalitat controlada i reproduïble, evidenciant que les cèl·lules en fase exponencial són més susceptibles als tractaments. En aquestes cèl·lules, el tractament amb BrEt genera una mortalitat excessiva i poc controlable, la qual cosa en limita l'ús en contextos aplicats. En canvi, l'exposició a radiació UV genera una reducció progressiva de la viabilitat amb valors de mortalitat ajustables en funció del temps d'exposició. L'ús de radiació UV en cèl·lules en fase exponencial ha permès establir un protocol de mutagènesi eficient i no transgènic, que no compromet l'estatus GRAS de *R. toruloides* ni el seu potencial ús en entorns industrials.

D'altra banda, el tractament aplicat ha permès obtenir mutants amb diferents graus de tolerància als inhibidors presents en els hidrolitzats vegetals, que representen una plataforma robusta per a la producció a gran escala de diversos compostos d'interès biotecnològic. Addicionalment, s'han obtingut mutants amb alteracions en la pigmentació i amb auxotròfies. Tots ells han pogut ser identificats i aïllats per mètodes microbiològics, però la validació completa de la seva identitat no ha estat possible. La microscòpia òptica ha permès avaluar la morfologia cel·lular i validar preliminarment l'espècie del mutant de resistència M06, però en el cas del mutant *white* MW3 no ha proporcionat resultats concloents. En estudis futurs, seria necessari realitzar una caracterització molecular que permeti validar la identitat de les soques, així com identificar les mutacions genètiques i alteracions metabòliques associades a cada fenotip.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abe, Keiko, i Tetsuo Sasakuma. 1986. «Identification of a Diploid Self-sporulating Cycle in the Basidiomycetous Yeast *Rhodospodium tovuoides*». *Journal of General Microbiology* 9861 (1): 1459-65.
- Alhattab, Mariam, Juliana Lebeau, Surinder Singh, i Munish Puri. 2025. «Mutagenesis treatment of *Mortierella alpina* for PUFA production enhancement for future food development». *Future Foods* 11 (juny):100605. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2025.100605>.
- BBC Research. 2025. «Carotenoids Market: Rising Demand for Natural Ingredients». <https://www.globenewswire.com/news-release/2025/07/01/3108727/0/en/Carotenoids-Market-Rising-Demand-for-Natural-Ingredients-and-Wellness-Products-Fuels-Global-Growth>
- Chang, Lulu, Hengqian Lu, Haiqin Chen, Xin Tang, Jianxin Zhao, Hao Zhang, Yong Q. Chen, i Wei Chen. 2022. «Lipid metabolism research in oleaginous fungus *Mortierella alpina*: Current progress and future prospects». *Biotechnology Advances* 54 (gener):107794. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2021.107794>.
- Cregg, James M., Joan Lin Cereghino, Jianying Shi, i David R. Higgins. 2000. «Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*». *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology* 16 (1): 23-52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>.
- Gadanhó, Mário, Diego Libkind, i José Paulo Sampaio. 2006. «Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian pyrite belt». *Microbial Ecology* 52 (3): 552-63. <https://doi.org/10.1007/S00248-006-9027-Y>.
- Ghanem, N. Z., Malla, S. R. L., Araki, N., & Lewis, L. K. 2019. «Quantitative assessment of changes in cell growth, size and morphology during telomere-initiated cellular senescence in *Saccharomyces cerevisiae*». *Experimental Cell Research*, 381(1), 18. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2019.05.005>
- IEA. 2024. «Renewables 2023, IEA». 2024. <https://www.iea.org/reports/renewables-2023/transport-biofuels>.
- Jha, S.N. 2024. «Biodiesel Market Size & Share | Growth Analysis By 2034». abril 2024. <https://www.factmr.com/report/biodiesel-market>.
- Malav, M. K., Sushil Kumar Kharia, S. P., K.R. Sheetal, S. K., & Kannojiya, S. 2017. «Furfural and 5-HMF: Potent fermentation inhibitors and their removal techniques». *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 2060–2066. <https://doi.org/10.20546/IJCMAS.2017.603.235>
- Marr, Kieren A., Christopher N. Lyons, Tiger Rustad, Raleigh A. Bowden, i Theodore C. White. 2018. «Rapid, Transient Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Is Associated with Increased mRNA Levels of CDR». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (10): 2584. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.10.2584>.
- Monteiro de Oliveira, P., Aborneva, D., Bonturi, N., & Lahtvee, P. J. 2021. «Screening and Growth Characterization of Non-conventional Yeasts in a Hemicellulosic

- Hydrolysate». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 659472. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.659472/FULL>
- Moser, Josef W., Roland Prielhofer, Samuel M. Gerner, Alexandra B. Graf, Iain B.H. Wilson, Diethard Mattanovich, i Martin Dragosits. 2017. «Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol-based growth media in the yeast *Pichia pastoris*». *Microbial Cell Factories* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0661-5>.
- Nacarelli, Timothy, Ashley Azar, i Christian Sell. 2014. «Inhibition of mTOR prevents ROS production initiated by ethidium bromide-induced mitochondrial DNA depletion». *Frontiers in Endocrinology* 5 (JUL). <https://doi.org/10.3389/FENDO.2014.00122>.
- Otoupal, Peter B., Gina M. Geiselman, Asun M. Oka, Carolina A. Barcelos, Hemant Choudhary, Duy Dinh, Wenqing Zhong, et al. 2022. «Advanced one-pot deconstruction and valorization of lignocellulosic biomass into triacetic acid lactone using *Rhodospiridium toruloides*». *Microbial Cell Factories* 21 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/S12934-022-01977-0/FIGURES/6>.
- Poulter, R. T.M., i E. H.A. Rikkerink. 1983. «Genetic analysis of red, adenine-requiring mutants of *Candida albicans*». *Journal of bacteriology* 156 (3): 1066-77. <https://doi.org/10.1128/JB.156.3.1066-1077.1983>.
- Priyadarshini, L. A. S., & Kataria, R. 2025. «Microbial synthesis and extraction of value-added metabolites by *Rhodotorula toruloides* from waste stream: a sustainable approach». *Microbial Cell Factories*, 24(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/S12934-025-02752->
- Qi, Feng, Yuki Kitahara, Zitian Wang, Xuebing Zhao, Wei Du, i Dehua Liu. 2014. «Novel mutant strains of *Rhodospiridium toruloides* by plasma mutagenesis approach and their tolerance for inhibitors in lignocellulosic hydrolyzate». *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 89 (5): 735-42. <https://doi.org/10.1002/JCTB.4180>
- Qi, Feng, Peijie Shen, Rongfei Hu, Ting Xue, Xianzhang Jiang, Lina Qin, Youqiang Chen, i Jianzhong Huang. 2020. «Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate». *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/S13068-020-01712-0/FIGURES/6>.
- Singh, Gunjan, Arshad Jawed, Debarati Paul, Kalyan K. Bandyopadhyay, Abha Kumari, i Shafiul Haque. 2016. «Concomitant production of lipids and carotenoids in *Rhodospiridium toruloides* under osmotic stress using response surface methodology». *Frontiers in Microbiology* 7 (OCT): 204088. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01686/BIBTEX>.
- Szotkowski, Martin, Žaneta Plhalová, Pavlína Sniegoňová, Jiří Holub, Oleg Chujanov, Dominika Špačková, Jana Blažková, i Ivana Márová. 2023. «Conversion of Mixed Waste Food Substrates by Carotenogenic Yeasts of *Rhodotorula* sp. Genus». *Microorganisms* 11 (4): 1013. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11041013/S1>.

- Uthayakumar, Deeva, Jehoshua Sharma, Lauren Wensing, i Rebecca S. Shapiro. 2021. «CRISPR-Based Genetic Manipulation of *Candida* Species: Historical Perspectives and Current Approaches». *Frontiers in genome editing* 2. <https://doi.org/10.3389/FGEED.2020.606281>.
- Wen, Zhiqiang, Sufang Zhang, Chuks Kenneth Odoh, Mingjie Jin, i Zongbao K. Zhao. 2020. «*Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond». *FEMS Yeast Research* 20 (5): 38. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOAA038>.
- Weninger, Astrid, Anna Maria Hatzl, Christian Schmid, Thomas Vogl, i Anton Glieder. 2016. «Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*». *Journal of Biotechnology* 235 (octubre):139-49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.027>.
- Xie, Zhuo Ting, Bing Qian Mi, Yong Jun Lu, Mou Tong Chen, i Zhi Wei Ye. 2024. «Research progress on carotenoid production by *Rhodospiridium toruloides*». *Applied Microbiology and Biotechnology* 2024 108:1 108 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12943-0>.
- Yamada, Ryosuke, Azusa Yamauchi, Tomomi Kashihara, i Hiroyasu Ogino. 2017. «Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis». *Biochemical Engineering Journal* 128 (desembre):76-82. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2017.09.010>.
- Zhang, Chaolei, Hongwei Shen, Xibin Zhang, Xue Yu, Han Wang, Shan Xiao, Jihui Wang, i Zongbao K. Zhao. 2016. «Combined mutagenesis of *Rhodospiridium toruloides* for improved production of carotenoids and lipids». *Biotechnology Letters* 38 (10): 1733-38. <https://doi.org/10.1007/S10529-016-2148-6/METRICS>.
- Zhang, Mengyao, Qidou Gao, Yijuan Liu, Zhumei Fang, Zhiwei Gong, Zongbao K. Zhao, i Xiaobing Yang. 2022. «Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for resveratrol production». *Microbial Cell Factories* 21 (1). <https://doi.org/10.1186/S12934-022-02006-W>.
- Zhao, Yihan, Yu Zhao, Renjie Fu, Tao Zhang, Jing Li, i Jianfa Zhang. 2021. «Transcriptomic and metabolomic profiling of a *Rhodotorula* color mutant to improve its lipid productivity in fed-batch fermentation». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37 (5): 1-10. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03043-0/METRICS>.
- Zhao, Yu, Baocai Song, Jing Li, i Jianfa Zhang. 2022. «*Rhodotorula toruloides*: an ideal microbial cell factory to produce oleochemicals, carotenoids, and other products». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 38 (1). <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03201-4>.

7. AUTOAVALUACIÓ

Quan vaig començar aquest treball em generava cert respecte la idea d'entrar al laboratori i que dels resultats que obtingués en depengués directament el meu treball. Alhora, ho veia com una oportunitat per posar a prova els coneixements adquirits al llarg de la carrera, especialment en l'àmbit de la microbiologia.

Al llarg del projecte he pogut assolir nous aprenentatges i reforçar-ne d'altres. M'he familiaritzat amb el maneig i cultiu de *R. toruloides* i, amb el temps, he après a identificar possibles contaminants, fins al punt de poder discriminar a simple vista entre la nostra soca i bacteris o altres espècies de llevats. A més, he treballat amb tècniques de mutagènesi i cultiu selectiu, que m'han permès posar en pràctica en un entorn real els conceptes teòrics vistos a classe.

Al llarg del treball hi ha hagut resultats que no coincidien amb el que esperàvem, i això m'ha obligat a aprendre a gestionar la incertesa. Amb el meu tutor Ricardo hem discutit sovint les dades, buscant el millor enfocament per continuar i adaptant les estratègies quan ha calgut. Aquest procés m'ha ajudat a entendre que al laboratori res no s'ha de donar per fet i que és essencial mantenir una mirada crítica en tot moment.

En l'àmbit personal, considero que he fet un progrés significatiu. He guanyat confiança i seguretat en mi mateixa dins del laboratori, he après a organitzar millor el temps i a resoldre problemes de manera autònoma. Sovint he comprovat que sabia més del que pensava i que era capaç de trobar solucions pràctiques als petits conflictes del dia a dia..

En conclusió, aquest projecte ha estat una experiència molt enriquidora que m'ha permès consolidar coneixements teòrics i, sobretot, créixer personalment i professionalment. Em sento satisfeta amb la feina feta i estic convençuda que les competències adquirides seran molt valuoses en el meu futur laboral, independentment de si continuo en l'àmbit de la recerca o en altres àrees vinculades a la biotecnologia.