**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

[ÍNDICE DE FIGURAS VII](#_Toc515324118)

[ÍNDICE DE TABLAS XI](#_Toc515324119)

[ABREVIATURAS XIII](#_Toc515324120)

[1 INTRODUCCIÓN GENERAL 1](#_Toc515324121)

[1.1 Carbohidratos 3](#_Toc515324122)

[1.1.1 Disacáridos 4](#_Toc515324123)

[1.1.2 Oligosacáridos 6](#_Toc515324124)

[1.1.3 Polisacáridos 12](#_Toc515324125)

[1.2 Glicosil hidrolasas 16](#_Toc515324126)

[1.2.1 Clasificación 17](#_Toc515324127)

[1.2.2 Mecanismo de hidrólisis de las glicosil hidrolasas 18](#_Toc515324128)

[1.2.3 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de celulosa 22](#_Toc515324129)

[1.2.3.1 Celulasas 22](#_Toc515324130)

[1.2.3.2 -glucosidasas (BGLs) 26](#_Toc515324131)

[1.2.4 Glicosil hidrolasas implicadas en la hidrólisis de almidón 30](#_Toc515324132)

[1.2.4.1 Amilasas 30](#_Toc515324133)

[1.2.4.2 -Glucosidasas 32](#_Toc515324134)

[1.3 Proteínas transportadoras de azúcares 34](#_Toc515324135)

[1.4 Biotecnología de carbohidratos 38](#_Toc515324136)

[1.4.1 Producción de biocombustibles 39](#_Toc515324137)

[1.4.2 Síntesis de oligosacáridos 46](#_Toc515324138)

[2 OBJETIVOS 59](#_Toc515324139)

[2.1 Objetivo general 61](#_Toc515324140)

[2.2 Objetivos específicos 61](#_Toc515324141)

[3 MATERIALES Y MÉTODOS 63](#_Toc515324142)

[3.1 Cepas utilizadas 65](#_Toc515324143)

[3.2 Medios y condiciones de cultivo 65](#_Toc515324144)

[3.2.1 Cultivo de *E. coli* 65](#_Toc515324145)

[3.2.2 Cultivo de levaduras y hongos 66](#_Toc515324146)

[3.3 Construcciones génicas 68](#_Toc515324147)

[3.3.1 Vectores utilizados 68](#_Toc515324148)

[3.3.2 Cebadores utilizados 69](#_Toc515324149)

[3.3.3 Obtención de DNA molde 71](#_Toc515324150)

[3.3.4 Plásmidos generados 72](#_Toc515324151)

[3.4 Cepas transformantes de levadura generadas 76](#_Toc515324152)

[3.5 Obtención de enzimas a partir de *T. reesei* 77](#_Toc515324153)

[3.6 Obtención de enzimas a partir de *S. cerevisiae* 78](#_Toc515324154)

[3.6.1 Obtención de -glucosidasas 78](#_Toc515324155)

[3.6.2 Obtención de -glucosidasa 79](#_Toc515324156)

[3.7 Ensayos de crecimiento y fermentación 79](#_Toc515324157)

[3.7.1 Crecimiento en celobiosa 79](#_Toc515324158)

[3.7.2 Ensayos de fermentación 80](#_Toc515324159)

[3.8 Ensayos enzimáticos 80](#_Toc515324160)

[3.8.1 Ensayo de actividad -glucosidasa 80](#_Toc515324161)

[3.8.1.1 Actividad hidrolítica con-pNPG como sustrato 81](#_Toc515324162)

[3.8.1.2 Celobiosa como sustrato 81](#_Toc515324163)

[3.8.2 Ensayo de actividad celulasa 82](#_Toc515324164)

[3.8.2.1 FPA (filter paper assay) 82](#_Toc515324165)

[3.8.2.2 Caracterización de los azúcares liberados en la hidrólisis de papel 83](#_Toc515324166)

[3.8.3 Ensayo de actividad -glucosidasa 83](#_Toc515324167)

[3.8.3.1 Actividad hidrolítica con -pNPG como sustrato 83](#_Toc515324168)

[3.8.3.2 Actividad transglicosilante 84](#_Toc515324169)

[3.9 Cuantificación de azúcares 85](#_Toc515324170)

[3.10 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) 85](#_Toc515324171)

[3.11 Análisis bioinformático 86](#_Toc515324172)

[3.11.1 Modelización y análisis estructural de proteínas 86](#_Toc515324173)

[3.11.2 Análisis filogenético 87](#_Toc515324174)

[4 CAPÍTULO I: Sinergias en la sacarificación y fermentación simultánea de celulosa 89](#_Toc515324175)

[4.1 Resultados 91](#_Toc515324176)

[4.1.1 Producción de enzimas celulolíticas de *Trichoderma reesei* 91](#_Toc515324177)

[4.1.2 Hidrólisis de papel usando el complejo celulolítico de *T. reesei* 92](#_Toc515324178)

[4.1.3 Comparación de la actividad -glucosidasa del cóctel enzimático de *T. reesei* y la producida por *S. cerevisiae* T500 94](#_Toc515324179)

[4.1.4 Sacarificación y fermentación simultánea de celulosa 96](#_Toc515324180)

[4.2 Discusión 98](#_Toc515324181)

[5 CAPÍTULO II: Fermentación de celobiosa por *S. cerevisiae*: análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular del azúcar 103](#_Toc515324182)

[5.1 Resultados 105](#_Toc515324183)

[5.1.1 Caracterización de -glucosidasas intracelulares 105](#_Toc515324184)

[5.1.2 Caracterización de proteínas transportadoras de azúcares 107](#_Toc515324185)

[5.1.3 Fermentación de celobiosa: análisis comparativo de hidrólisis intra y extracelular 111](#_Toc515324186)

[5.2 Discusión 115](#_Toc515324187)

[6 CAPÍTULO III: Producción de IMOS 125](#_Toc515324188)

[6.1 Resultados 127](#_Toc515324189)

[6.1.1 Expresión del gen *aglA* de *A. niger* en *S. cerevisiae* 127](#_Toc515324190)

[6.1.2 Análisis de la formación de IMOS 129](#_Toc515324191)

[6.1.3 Anclaje de AglA a la superficie celular de *S. cerevisiae* 133](#_Toc515324192)

[6.1.4 Síntesis de panosa o isomaltosa por transglicosilación en función del aceptor del grupo glucosilo 135](#_Toc515324193)

[6.1.5 Síntesis de otros productos de transglicosilación usando diferentes aceptores 137](#_Toc515324194)

[6.2 Discusión 139](#_Toc515324195)

[7 CONCLUSIONES 143](#_Toc515324196)

[8 BIBLIOGRAFÍA 149](#_Toc515324197)

[9 ANEXOS 197](#_Toc515324198)