**RESUMEN**

En el presente trabajo se caracterizaron glicosil hidrolasas (GHs) y permeasas fúngicas implicadas en el metabolismo y transporte de azúcares, con dos aplicaciones diferentes: la producción de etanol y la síntesis de isomaltooligosacáridos (IMOS). Se han abordado tres objetivos específicos: 1) desarrollar un proceso eficiente de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) de celulosa; 2) comparar distintas estrategias para la fermentación de celobiosa, paso crítico en la fermentación de celulosa; 3) sintetizar IMOS utilizando como material catalítico células de levadura que producen una-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

En el proceso propuesto de sacarificación y fermentación simultánea celulosa, el material de partida (papel de filtro) se digirió con una preparación enzimática de *Trichodema reesei*, y se fermentó con una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (T500) que secreta una -glucosidasa de *Saccharomycopsis fibuligera*. La actividad -glucosidasa, deficitaria en el cóctel celulolítico de *T. reesei*, mejoró el progreso de la hidrólisis de la celulosa y la fermentación, ya que disminuye el efecto inhibitorio causado por la acumulación de celobiosa. Con este proceso se alcanzaron rendimientos de etanol por encima de 70 g/L.

Se han comparado estrategias de hidrólisis extracelular o intracelular de celobiosa. Para ello, se utilizó la cepa T500 y nuevas cepas recombinantes generadas en este estudio. En una primera aproximación para la hidrólisis intracelular, se ensayaron tres -glucosidasas distintas y una permeasa de celobiosa de *Penicillium oxalicum.* En los transformantes resultantes, la tasa de crecimiento en celobiosa se vio limitada por -glucosidasas con baja actividad celobiasa, pero por encima de cierto valor de actividad el principal cuello de botella fue el transporte del azúcar. Por esta razón, buscamos nuevos transportadores de celobiosa procedentes de *T. reesei*. De 107 secuencias designadas como transportadores de azúcares en el genoma de *T. reesei*, se seleccionaron diez por su mayor similitud de secuencia con permeasas de celobiosa de otros hongos caracterizadas funcionalmente. Solo una de ellas (Tr\_StrC) fue capaz de facilitar el transporte de celobiosa y permitir el crecimiento de *S. cerevisiae*. Finalmente, se comparó la capacidad de fermentar celobiosa de los dobles transformantes de levadura, con capacidad de transportar e hidrolizar intracelularmente el disacárido, con la del transformante T500. La estrategia extracelular permitió una tasa de fermentación más rápida y mayores rendimientos de etanol en comparación con la estrategia intracelular. La cepa T500 también fue más eficiente en un sistema SSF de celulosa.

Se han construido y analizado cepas recombinantes de *S. cerevisiae* que expresan un gen (*aglA*) que codifica una -glucosidasa de *A. niger*. Los transformantes de levadura produjeron actividad -glucosidasa extracelularmente, la mitad de la cual quedó asociada a células y la otra mitad fue liberada al medio de cultivo. Usando maltosa como único sustrato de partida, tras 8 h de incubación, el principal producto de transglicosilación fue panosa, pero tras 24 h el producto predominante fue isomaltosa. La isomaltosa también predominó a tiempos cortos de reacción, si en lugar de sólo maltosa se utilizaba de partida una mezcla de maltosa y glucosa. Para facilitar la síntesis de IMOS se diseñó un proceso en el cual las células de levadura pueden ser utilizadas directamente como material catalítico. Para ello, se expresaron en *S. cerevisiae* construcciones génicas del gen *aglA* fusionado con el gen de levadura *SED1*, en versión completa o truncada, que posee la secuencia GPI (glicosilfosfatidil inositol) de anclaje a pared celular. Las enzimas híbridas resultantes se fijaron de forma estable a la superficie celular. Las células provenientes de los cultivos recombinantes que expresan las construcciones *aglA-SED1* se pudieron reciclar para producir IMOS en reacciones sucesivas.