
**BÚSQUEDA DE LAS MEJORES CONDICIONES PARA
LA EXTRACCIÓN Y MEDIDA DE ACTIVIDAD DE CELULASA
Y XILANASA EXTRAÍDAS DE LA CORTEZA DE PITAYA
AMARILLA (*Acanthocereus pitajaya*)**

**Searching the Best Conditions for the Extraction and Activity
Measurement of Cellulase and Xylanase Extracted from the Yellow
Pitaya Fruit Peel (*Acanthocereus pitajaya*)**

YENNY MARITZA DUEÑAS GÓMEZ^{1*}, M.Sc. Química; CARLOS
EDUARDO NARVÁEZ CUENCA^{1**}, M.Sc. Química; LUZ PATRICIA
RESTREPO SÁNCHEZ^{1***}, M.Sc. Química.

¹Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias,
Departamento de Química. Carrera 30 No.45-03, Bogotá.

*yemadugo@hotmail.com, **cenarvaezc@unal.edu.co

***lprestrepos@unal.edu.co

Presentado 26 de febrero de 2007, aceptado 25 de enero de 2008, correcciones 15 de febrero de 2008.

RESUMEN

Para pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*) se ha encontrado que el ablandamiento excesivo de la cáscara contribuye al deterioro del fruto, al aplicar diferentes técnicas de conservación en fresco. Dado que tanto la celulasa como la xilanasa se han vinculado con el ablandamiento de la cáscara de frutos, este trabajo se basó en la búsqueda de las mejores condiciones de extracción y medida de actividad de celulasa y xilanasa. El mejor sistema de extracción fue buffer fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0. Para la medida de actividad de celulasa es necesario incubar durante 60 min a 37 °C, con un volumen de extracto enzimático crudo de 30 µL, empleando buffer acetato 100 mM a pH 5,0; los valores de constante aparente de Michaelis Menten (K_m aparente) y velocidad máxima ($V_{MÁX}$) fueron 0,279 mg/mL y 0,00014 nmol glucosa/min, respectivamente. Para determinar la actividad de xilanasa se establecieron 15 min de tiempo de incubación, a 50 °C, empleando 30 µL de extracto enzimático crudo a pH 4,0 (buffer acetato 100 mM); los valores de K_M aparente y $V_{MÁX}$ para xilanasa fueron 0,073 mg/mL y 0,0011 nmol glucosa/min, respectivamente.

Palabras clave: celulasa, xilanasa, pitaya amarilla, *Acanthocereus pitajaya*, ablandamiento.

ABSTRACT

By applying different conservation techniques on yellow pitaya fruit (*Acanthocereus pitajaya*) it has been found that excessive softening of the peel contributes to the deterioration of the fruit. Due to that both cellulase and xylanase have been related to the softening of the fruit's peel; this work was based on the search of the best conditions

not only for the extraction, but also for the activity measurement of both cellulase and xylanase. The best extraction system for both enzymes was 20 mM buffer phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.0. For the cellulase activity measurement it was necessary to incubate during 60 min at 37 °C, with a volume of raw enzymatic extract of 30 µL, using buffer acetate 100 mM at pH 5,0; the values of apparent K_M and V_{MAX} were 0.279 mg/mL and 0.00014 nmol glucose/min, respectively. To determine the xylanase activity it was necessary to incubate during 15 min, at 50 °C, using 30 µL of raw enzymatic extract at pH 4.0 with 100 mM buffer acetate; the values of apparent K_M and V_{MAX} for this enzyme were 0.073 mg/mL and 0.0011 nmol glucose/min, respectively.

Key words: Cellulase, xylanase, yellow pitaya, *Acanthocereus pitajaya*, softening.

INTRODUCCIÓN

Durante la etapa de maduración, los frutos climatéricos son susceptibles a cambios que involucran el ablandamiento de la corteza, disminución de la viscosidad y pérdida de rigidez en la pared celular. Las sustancias encargadas de la rigidez son principalmente carbohidratos como celulosa, hemicelulosa, pectina y polímeros fenólicos como la lignina (Fennema, 1996). Es por ello, que cuando el fruto se encuentra en las fases de maduración y senescencia, es recurrente la descompartimentalización de la pared celular primaria y la estructura de la lámina media, ocasionados por la acción de enzimas tipo hidrolasas tales como pectinesterasa, poligalacturonasa, celulasa y xilanasa, entre otras; las cuales hidrolizan el ácido poligalacturónico, la celulosa y la hemicelulosa, respectivamente, incidiendo en la calidad físico-química y sensorial de los frutos. Dentro del amplio grupo de frutos climatéricos se encuentra la pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), catalogada como fruta exótica, muy apetecida para su consumo en diversos países del mundo, gracias a su sabor, aroma y propiedades como alimento funcional (Montoya, 1990). Sin embargo, su tiempo de vida útil es corto debido a los diferentes procesos bioquímicos que se suceden luego de la cosecha, ocasionando una disminución en la calidad. Debido a que el ablandamiento excesivo, evidenciado principalmente en la corteza, incide de manera negativa en el tiempo de vida útil, en el presente trabajo se evaluaron las mejores condiciones de extracción y de medida de actividad de celulasa y xilanasa en dicha fruta. Con esta información se espera disponer, para futuros trabajos, de una metodología adecuada de extracción y medida de actividad de celulasa y xilanasa que permita evaluar su papel en el ablandamiento de la corteza de pitaya amarilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se emplearon las cortezas de pitaya amarilla adquiridas en la ciudad de Bogotá, en condiciones óptimas de madurez sensorial (criterio 100% amarilla), completamente sanas, sin magulladuras ni olores extraños. Los frutos fueron lavados y desinfectados previamente con hipoclorito de sodio al 1%.

EXTRACCIÓN DE LAS ENZIMAS

La técnica propuesta para la extracción de celulasa y xilanasa se basó en trabajos previos efectuados en frutos como banano (Srivastava y Dwivedi, 2000), pimentón (Priya *et al.*, 1995) y guayaba (Abu-Bark *et al.*, 2003). El procedimiento consistió en la obtención de polvos de acetona, para lo cual se homogenizó la corteza de la fruta con acetona a 4 °C, posteriormente se filtró sobre tela. El pélet obtenido se resuspendió en buffer fosfato 20 mM pH 7,0 y se agitó durante 24 h a 2 °C. Luego se centrifugó a 6.000 x g durante 1 h a 4°C. El residuo fue desechado y en el sobrenadante se efectuaron las medidas de proteína y de actividad.

Parámetros evaluados en la extracción. Como las enzimas del ablandamiento tienen su actividad en la pared celular, al buffer de extracción se le adicionó NaCl 1,0 M o Tritón 1,0% (Deng *et al.*, 2005; Kemmerer y Tucker, 1994; Srivastava *et al.*, 2000), con el propósito de solubilizar las enzimas por efecto de la fuerza iónica o por acción del detergente, respectivamente. Seleccionado el mejor agente solubilizante se varió la concentración de éste en el medio de extracción, entre 0,0 y 1,0 M. Los extractos que contenían Tritón fueron dializados contra agua durante 24 h, con un total de seis cambios de agua, con relación extracto a agua de 10 mL a 500 mL, y una membrana con tamaño de poro de 12 kDa.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

En los extractos enzimáticos se cuantificó la proteína por el método de Bradford modificado por Zor y Sellinger (1996), con lectura de absorbancia a 450 y 590 nm, con albúmina bovina (BSA) como estándar.

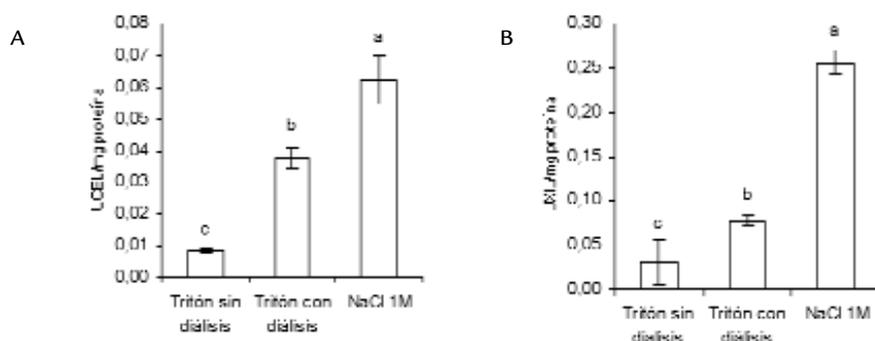


Figura 1. Efecto de la incorporación de Tritón y NaCl al buffer de extracción, fosfato de sodio 20 mM pH 7,0, sobre la actividad de (A) celulasa y (B) xilanasa. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

MEDIDA DE ACTIVIDAD DE CELULASA Y XILANASA

La actividad de ambas enzimas fue determinada por medida espectrofotométrica de los azúcares reductores generados tras la acción de la enzima sobre el sustrato respectivo (carboximetilcelulosa para celulasa y xilano para xilanasa), por el método de Nelson (1944), modificado por Somogyi (1952). La formación de azúcares reductores se calculó empleando D-Glucosa como patrón de cuantificación. Una unidad (U) de la

enzima cataliza la liberación de un nmol de glucosa en 1 min en las condiciones de ensayo (Srivastava y Dwivedi, 2000; Priya *et al.*, 1995). La actividad específica fue expresada como U/mg proteína. La carboximetilcelulosa fue adquirida de MERK® y el xilano, de hojuelas de avena, adquirido de SIGMA®. Se hicieron blancos de buffer, de reactivos y de extracto crudo.

Parámetros evaluados en la medida de actividad. Se evaluó el efecto del tiempo de incubación (para celulasa 1 a 22 h, para xilanasa 15 min a 2 h), del volumen de extracto enzimático crudo empleado (30 y 60 μ L, para ambas), de la concentración de NaCl en la mezcla de reacción (0,06 a 0,12 M). Se evaluó la incidencia del pH (3,7 a 5,5) con acetato de sodio-ácido acético 100 mM, de la temperatura (25 a 70 °C) y de la concentración de sustrato (0,01 a 2,0 mg/mL de carboximetilcelulosa para celulasa y 0,006 a 0,2 mg/mL de xilano para xilanasa). Con los resultados obtenidos en este punto, se determinó el valor de la constante aparente de Michaelis-Menten, K_M y la velocidad máxima de la reacción, V_{MAX} .

ANÁLISIS DE DATOS

Para cada ensayo se calculó el promedio y la desviación estándar de las medidas de proteína y actividad enzimática (n=9). También se realizaron los ANDEVA de un factor para el diseño planteado (un paso a la vez), de dos factores para el efecto del tiempo de incubación con respecto al volumen de extracto enzimático crudo y se compararon las diferencias entre los niveles de cada parámetro por la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

PARÁMETROS EVALUADOS EN LA EXTRACCION DE CELULASA Y DE XILANASA

El ANDEVA mostró que las variables estudiadas durante la extracción afectan de manera significativa la actividad de celulasa y xilanasa, excepto cuando se varió la concentración de NaCl en el buffer de extracción, en el cual solo se encontró efecto significativo para celulasa. En todos los casos, los blancos de extracto crudo dieron valores de absorbancia bajos.

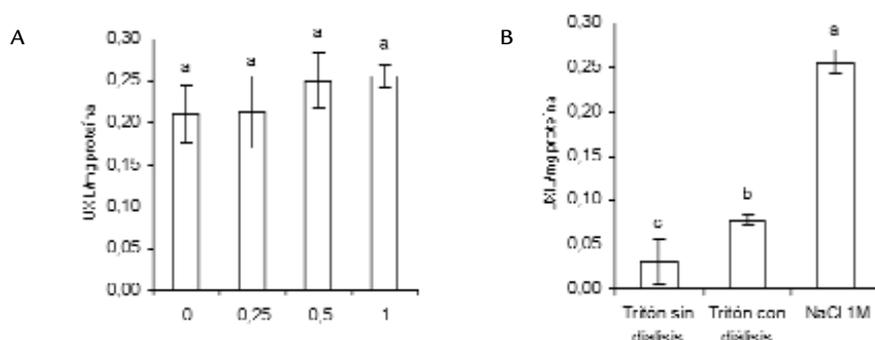


Figura 2. Comportamiento de la actividad de (A) celulasa y (B) xilanasa frente a la variación en la concentración de NaCl en el buffer de extracción, fosfato de sodio 20 mM pH 7,0. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones \pm 1 SD.

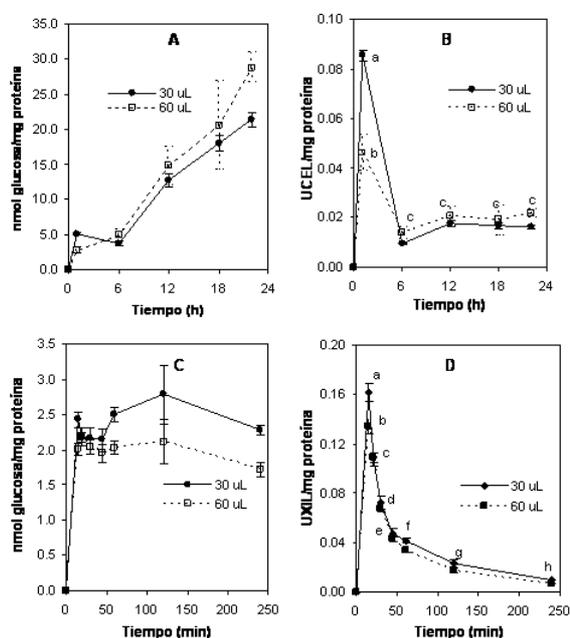


Figura 3. (A) nmol glucosa /mg proteína generados por acción de celulasa, (B) Actividad de celulasa como respuesta al volumen de extracto enzimático empleado y al tiempo de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

Al emplear Tritón 1% en el buffer de extracción, se extrajeron 7,6 veces más proteína que la extraída con NaCl 1M. Así, las extracciones con Tritón 1% o NaCl 1 M fueron respectivamente, $4,95 \pm 0,08$ y $0,65 \pm 0,00$ mg proteína/g corteza. Para estimar la proteína extraída al adicionar Tritón al buffer de extracción fue necesario dializar, debido a la interferencia de este aditivo en la técnica empleada. En la figura 1 se representa el efecto de la adición de Tritón y de NaCl al buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,0 sobre la actividad de las enzimas en estudio. Al efectuar la diálisis a los extractos que contenían Tritón se incrementó la actividad tanto de celulasa como de xilanas. De otro lado, en la misma figura se observa que al emplear NaCl en el buffer de extracción la actividad se intensificó a pesar de haber extraído una cantidad menor de proteína. Debido a que los iones sodio pueden estimular la actividad de las enzimas en estudio (Chivero *et al.*, 2000), para dejar el mismo efecto de esta sal, en los tres tratamientos, la cantidad de NaCl al momento de medir la actividad fue igual.

Teniendo en cuenta que con el NaCl la respuesta en la medida de actividad de las enzimas fue la mejor, se varió la concentración de este aditivo en el buffer de extracción (Fig. 2). Se encontró que al incrementar la concentración de la sal, la actividad de celulasa fue favorecida, en tanto que en xilanas la respuesta fue independiente de la concentración de esta sal. Se podría pensar que lo observado en este ensayo fue el resultado tanto de la modificación en la extracción de las enzimas como de un efecto activante sobre la actividad. Sin embargo, en este ensayo, para nivelar el efecto activan-

te, la concentración de NaCl en la medida fue siempre la misma: 0,12 M, por lo que lo observado para celulasa se debió exclusivamente al aumento en la extracción de esta enzima. De acuerdo a los anteriores resultados la extracción de las enzimas celulasa y xilanasa podría efectuarse con buffer fosfatos 20 mM más NaCl en concentraciones entre 0,25 a 1,00 M a pH 7,0. Para los siguientes experimentos las extracciones se efectuaron con NaCl 0,5 M.

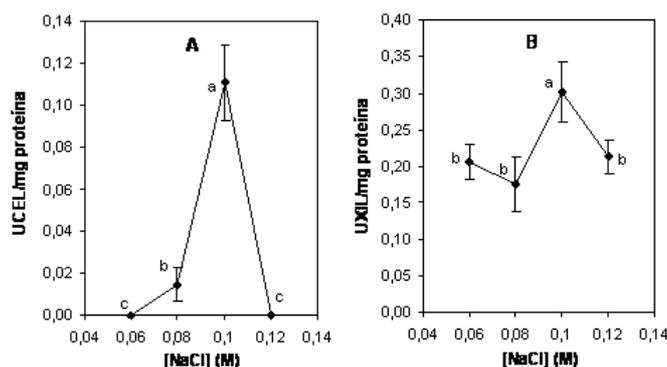


Figura 4. Efecto de la concentración de NaCl en la actividad de (A) celulasa y (B) xilanasa. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

PARÁMETROS EVALUADOS EN LAS MEDIDAS DE ACTIVIDAD DE CELULASA Y XILANASA

Basados en el ANDEVA realizado en esta parte del trabajo, se encontró que los parámetros: volumen de extracto, tiempo de reacción, concentración de NaCl, pH, temperatura y concentración de sustrato afectan de manera significativa la actividad de celulasa y xilanasa. Inicialmente, se evaluaron el efecto del volumen de extracto y del tiempo de reacción. En la figura 3A se observa que la respuesta (nmol glucosa/mg proteína) generada por acción de la celulasa se incrementó a medida que se aumentaba el tiempo de incubación. Al realizar las medidas con un volumen de extracto enzimático de 60 mL se obtuvo una mayor respuesta (al evaluar el promedio de toda la población) que la obtenida con 30 mL. Sin embargo, al graficar la actividad (nmol glucosa/min/mg proteína) en función del tiempo de incubación (Fig. 3B) se obtuvo una mejor respuesta para un tiempo de incubación de 1 h y un volumen de extracto enzimático de 30 μ L. De otro lado, en la figura 3C se aprecia que al variar el tiempo de incubación para xilanasa se obtuvo una producción de nmol glucosa/mg proteína que no cambió en gran medida con el tiempo de incubación, de tal manera que desde el menor tiempo ensayado (15 min) se obtuvo un valor máximo en la respuesta. Con la intención de ubicar una zona en la cual hubiera aumento en la respuesta al incrementar el tiempo, se ensayaron tiempos menores de incubación; sin embargo, no se obtuvieron respuestas cuantificables. Al graficar la actividad de xilanasa (nmol glucosa/min/mg proteína) en función del tiempo de incubación (figura 3D) se obtuvo una mejor respuesta para un tiempo de incubación de 15 min y un volumen de extracto enzimático de 30 μ L. Para los siguientes ensayos de medida de actividad se decidió emplear un volumen de extracto enzimático de 30 μ L para celulasa y xilanasa, con tiempos de incubación de 60 y 15 min respectivamente.

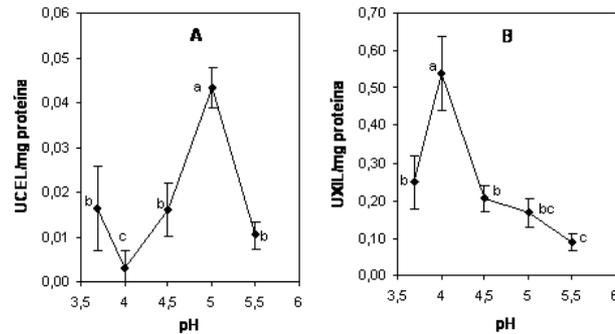


Figura 5. Efecto del pH en la actividad de (A) celulasa y (B) xilanasa. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

El efecto de la concentración salina en la mezcla de reacción se observa en la figura 4. La actividad de celulasa se incrementó al aumentar la concentración de NaCl desde 0,6 hasta 1,0 M y disminuyó a valores no cuantificables a una concentración de NaCl de 0,12 M. Para xilanasa también se observó un máximo de actividad a una concentración de NaCl de 0,1 M. Para los siguientes ensayos la concentración de NaCl en la medida se ajustó a 0,1 M para ambas enzimas. Al evaluar el efecto del pH (Fig. 5) se encontró un máximo de actividad de celulasa a pH 5,0, en tanto que para xilanasa el pH para la máxima actividad fue de 4,0. La actividad de ambas enzimas varió también respecto a la temperatura de incubación (Fig. 6). El valor más alto de actividad de celulasa se hizo evidente a los 37 °C, mientras que para xilanasa la temperatura óptima fue de 50 °C. En la figura 7 se muestra el efecto de la variación de la concentración de carboximetilcelulosa sobre la velocidad con que actúa la celulasa y, de xilano sobre la velocidad de xilanasa. Las respuestas en esta figura son menores, respecto a los otros ensayos, debido a que no están referidas a mg de proteína (la cantidad de proteína presente en cada ensayo fue siempre menor que 1). Desde el inicio de las concentraciones ensayadas, se observó un incremento en la velocidad enzimática, hasta llegar a un máximo, después del cual se mantuvo el mismo intervalo de actividad. La velocidad de celulasa fue máxima entre 1 a 2 mg carboximetilcelulosa/mL, en tanto que la velocidad de xilanasa fue máxima entre 0,1 a 0,2 mg xilano/mL. En la figura 8 se representa la linealización de Lineweaver-Burk, para determinar el valor aparente de K_M y la $V_{M\acute{a}x}$ para las dos enzimas en estudio. Los valores de estas constantes aparecen en la tabla 1. El coeficiente de regresión lineal fue estadísticamente significativo para ambas enzimas.

	Celulasa (carboximetilcelulosa)	Xilanasa (xilano)
Linealización por Lineweaver-Burk	$y = 1968,5x + 7043,2$	$Y = 6,832x + 932,32$
r	0,9430	0,9711
K_M aparente (mg/mL)	0,279	0,073
$V_{M\acute{a}x}$ (U)	0,00014	0,0011

Tabla 1. Valores aparentes de K_M $V_{M\acute{a}x}$ de celulasa y xilanasa extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*).

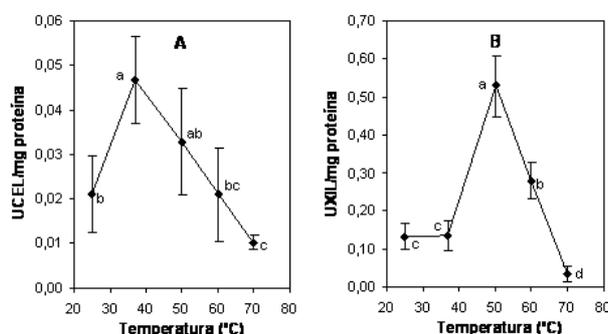


Figura 6. Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad de (A) celulasa y (B) xilanasa. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

DISCUSIÓN

Al emplear la acetona como etapa previa a la extracción, buena parte de los compuestos reductores se debieron eliminar en forma soluble y se separaron de las proteínas precipitadas, por lo que las medidas de los blancos de extracto enzimático crudo dieron valores de absorbancia bajos. Durante la extracción se evidenció una mayor capacidad de extracción de proteínas al emplear Tritón. Si se tiene presente su efecto surfactante, este aditivo es capaz de romper todo tipo de tejidos, con mayor cantidad de proteína asociada a la pared celular (Pathak y Sanwal, 1998), mientras que el NaCl es un extractante más selectivo de las proteínas con interacciones electrostáticas. Aunque con Tritón se obtuvo una mayor extracción de proteínas, la actividad enzimática lograda al emplear NaCl en el buffer de extracción fue mayor, por lo que el NaCl fue más selectivo hacia la extracción de las enzimas celulasa y xilanasa. El tiempo de incubación disminuyó la actividad enzimática, debido a que al aumentar el tiempo se favoreció la inactivación de la enzima, ya sea por la poca estabilidad térmica o por la generación de los productos que inhiben la acción enzimática (Muchuweti *et al.*, 2005).

La dependencia observada entre la concentración de NaCl presente al momento de medir la actividad enzimática y la respuesta en la actividad muestran el papel importante del ión Na^+ en este tipo de enzimas. Este comportamiento soporta lo demostrado por Chivero *et al.* (2001) quienes afirman que los iones de sodio incrementan la actividad de la xilanasa. Se aprecia entonces, que el NaCl no solo mejora la extracción de celulasa sino que también activa ambas enzimas: celulasa y xilanasa. El pH de máxima actividad de celulasa coincide con estudios realizados en uva (Deng *et al.*, 2005), banano (Srivastava y Dwivedi, 2000) y pimiento (Priya *et al.*, 1995). De otro lado, se sabe que la xilanasa presenta su mejor actividad a pHs ácidos (Dhillon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003). El que las enzimas tengan su máxima actividad en pHs ácidos se debe a que la concentración de H^+ afecta la velocidad de reacción, así como también el medio celular en el cual desarrollan su catálisis (Carrillo, 2002). A pHs más altos, para ambas enzimas, la actividad no se favorece probablemente por la modificación de las enzimas en su sitio activo (Carrillo, 2002).

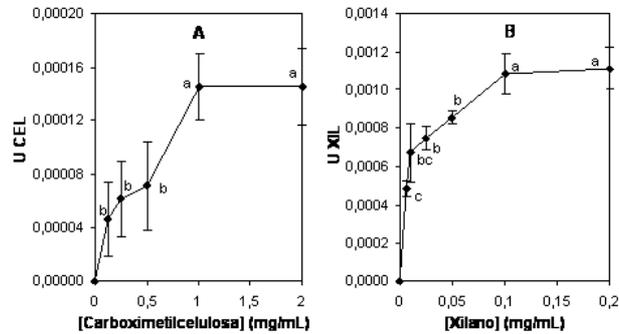


Figura 7. Efecto de la concentración de (A) carboximetilcelulosa sobre la actividad de celulasa y de (B) xilano sobre la actividad de xilanasa. Letras diferentes en cada medida de velocidad (U) indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Fischer ($\alpha = 0,05$). Los resultados son el promedio de 9 determinaciones ± 1 SD.

La temperatura que generó el valor más alto de actividad de celulasa, 37 °C, es similar a lo encontrado para uva (Deng *et al.*, 2005), banano (Srivastava y Dwivedi, 2000) y pimiento (Priya *et al.*, 1995). Para el caso de xilanasa, la temperatura óptima, 50 °C, coincide con reportes previos efectuados por Chivero *et al.* (2001) y Wang *et al.* (2003), quienes enuncian que su máxima actividad se encuentra entre 50 a 65 °C. En la literatura revisada no aparecen reportes acerca del K_M aparente y $V_{M\acute{a}x}$ de celulasa y xilanasa en tejidos vegetales, lo que dificulta establecer una comparación de éstas. Sin embargo, existe un reporte para poligalacturonasa extraída de la corteza de la pitaya amarilla (Rodríguez *et al.*, 2006), en el que se indica que el valor aparente de K_M es 2,88 mg/ml, por lo que de estas tres hidrolasas, la xilanasa es quien tiene una mayor afinidad por el sustrato, seguida por la celulasa, con la poligalacturonasa como la menos afín por su sustrato. Las mejores condiciones de extracción y de medida de actividad para cada una de las enzimas se ilustran en la tabla 2. La información consignada en esta tabla será usada en futuros trabajos para continuar con el estudio de este tipo de enzimas y su posible relación con el ablandamiento de la pitaya amarilla.

	Condiciones para la extracción	Condiciones para la medida de actividad					
	Buffer de extracción	Tiempo	Volumen de extracto enzimático crudo	[NaCl]	pH (Buffer acetato 100 mM)	Temperatura (° C)	[Sustrato] (mg/mL)
Celulasa	Fosfato 20 mM, pH 7,0 + NaCl 0,5 M	1 h	30 μ L	0,1 M	5,0	37	1,0 de CMC
Xilanasa		15 min			4,0	50	0,1 de xilano

Tabla 2. Condiciones para la extracción y medida de actividad para celulasa y xilanasa extraídas de la corteza de pitaya amarilla.

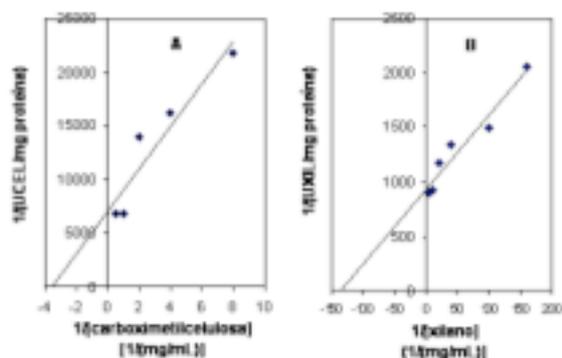


Figura 8. Linealización de Lineweaver – Burk para (A) celulasa y (B) xilanasa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo económico a través de la DIB, proyecto código: 8003003.

BIBLIOGRAFÍA

- CARRILLO F. Estudio del comportamiento de la fibra *lyocell* frente a la hidrólisis enzimática con celulasas. En: *Reference review (on line)*, 123-163 http://www.tdx.cesca.es/ TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0905102- 14432//09CAPITULO4.pdf, 2002; (Acceso: Marzo 2006).
- CHIVERO E, MUTUKUMIRA A, ZVAUYA R. Partial Purification And Characterization Of A Xylanase Enzyme Produced By A Micro-Organism Isolated From Selected Indigenous Fruits Of Zimbabwe. *Food Chem.* 2001;72:179-185.
- DENG Y, WU Y, LI Y. Changes In Firmness, Cell Wall Composition And Cell Wall Hydrolases Of Grapes Stored In High Oxygen Atmospheres. *Food Rese Intern.* 2005;38:769-776.
- DHILLON A, GUPTA J, KHANNA S. Enhanced Production And Characterization Of A Novel Cellulose-Poor Thermostable, Alkalitolerant Xylanase From *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochem.* 2000;35:849-856.
- FENNEMA O. *Química de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.; 1996.
- MONTOYA B. *Análisis del crecimiento y desarrollo vegetativo de la pitaya amarilla [trabajo de grado]*. Bogotá: Departamento de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia; 1990.
- MUCHUWETI M, MOYO E, MUSHIPE S. Some Properties Of The Polygalactunase From Four Zimbabwean Wild Fruits (*Uupaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* and *Berchemia discolor* fruits). *Food Chem.* 2005;90:655-661.
- NELSON N. A Photometric Adaptation Of The Somogyi Method For Determination Of Glucose. *J Biol Chem.* 1944;153:378-380.
- PATHAK N, SANWAL G. Multiple Forms Of Polygalacturonase From Banana Fruits. *Phytochem.* 1998;48:249-255.

PRIYA K, PRABHA T, THARANATHAN R. Postharvest Biochemical Changes Associated With The Softening Phenomenon In *Capsicum annuum* Fruits. Phytochem. 1995;42:961-966.

SOMOGYI M. Notes On Sugar Determination. J. Biol Chem. 1952;195:19-23.

SRIVASTAVA M, DWIVEDI U. Delayed Ripening Of Banana Fruit By Salicylic Acid. Plant Sci. 2000;158:87-96.

WANG YS, TIAN SP, XU Y. Effects Of High Oxygen Concentration On Pro- And Anti-Oxidant Enzymes In Peach Fruits During Postharvest Periods. Food Chem. 2005;91(1):99-104.

ZOR T, SELLINGER Z. Linearization Of The Bradford Protein Assay Increases Its Sensivity: Theoretical And Experimental Studies. Anal Biochem. 1996;236:302-308.

