

Floc de bebidas ácidas en azúcar blanco del noroeste de Argentina

Marcelo Ruiz*, Marcos Sastre Siladji*, Mónica Coronel*, Silvia Zossi*, Oscar Diez** y Michael Saska**

RESUMEN

En este trabajo se probaron distintos indicadores potenciales de floc en bebidas ácidas (ABF). Al contrario de los trabajos previos, ni el contenido de proteínas en azúcar ni la relación de las absorbancias (AR) medidas a pH 9 y 3 tuvieron correlación con la predisposición del azúcar a flocular, determinada por el método oficial. La comparación entre azúcares refinados de dos refinерías argentinas, con esquemas distintos de refinamiento, reveló una incidencia relativamente alta a un comportamiento floc positivo (f+) que, sin embargo, no mostró relación con sus contenidos de proteínas. Para estudiar la formación de ABF en el proceso, se modificó el método oficial ICUMSA y se aplicó a muestras de jugos de caña clarificados preparados en distintas condiciones. Los resultados mostraron que a pesar del contenido relativamente alto de no azúcares, alrededor de dos tercios de las muestras resultaron f-. Los niveles de proteínas en jugos de caña limpia clarificados por sulfitación fueron aproximadamente la mitad de los que se prepararon por carbonatación y aproximadamente menos del 30% de aquellos obtenidos de caña con trash. El mismo porcentaje (31%) de jugos sulfitados y carbonatados resultaron f+. El estacionamiento aumento la incidencia al comportamiento f+ en jugos de caña estacionada en comparación con aquellos producidos a partir de caña fresca. También se determinaron en jugos clarificados dos indicadores adicionales basados en la absorbancia y se encontró que ambos respondían a la tendencia esperada al ser más altos en los jugos de caña con trash, en caña estacionada y en jugos con resultados f+ determinados con el método visual.

Palabras clave: azúcar refinado, azúcar blanco, calidad de azúcar, floc en bebidas ácidas, floculación.

ABSTRACT

Acid beverage floc in white cane sugar in norwest of Argentina

In this work, several indicators of tendency of white sugar to form acid beverage floc (ABF) were investigated. Contrary to previous reports, neither the protein content of the sugar or its absorbance ratio at pH 9 and 3, respectively, were found to correlate with the flocking behavior as determined by the official method. Comparison of refined sugar produced by two Argentine refineries with different production schemes revealed relatively high incidence of floc-positive (f+) behavior which however did not correlate with the sugar's protein content.

To better understand behavior of potential ABF precursors in the sugar process, the official 10-day method for sugar was modified and applied to clarified juice (CJ) samples produced in the lab under various conditions. Protein levels in CJ produced from clean cane by sulfitation were about one half of those prepared by carbonatation and about 30% less than those produced from cane with trash. About one third (31%) of both sulfitation and carbonatation CJ samples were found f+. Storing cane before milling increased the f+ incidence of CJ with respect to the juices produced from fresh cane. Two alternative indicators of flocking behavior in CJ based on absorbance measurement were determined, and found to correspond with the expected behavior; i.e. being higher in juices from cane with trash and stored cane, as determined by the modified 10-day visual method.

Key words: refined sugar, white sugar, sugar quality, acid beverage floc, floculation.



Paper presented at the XXVIII Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Sao Paulo, Brazil, 24-27 June 2013 and published here with the agreement of the Society.

*Sección Química de Productos Agroindustriales. Email: marceloruiz@eeaac.org.ar.

** Sección Ingeniería y Proyectos Agroindustriales.

*** Investigador visitante.

INTRODUCCIÓN

La tendencia a formar flóculos en medio ácido (ABF por sus siglas en inglés) es una característica desfavorable de algunos azúcares blancos. Recientemente, en trabajos realizados en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, se encontró que alrededor del 40% del azúcar refinado y 65% del azúcar común, de un conjunto de muestras de Argentina y de otros países latinoamericanos, formaban flóculos en medio ácido (Coronel *et al*, 2002; Ruiz *et al*, 2013).

En la literatura existen diversas teorías acerca de su formación, si bien el mecanismo por el cual se producen aún no fue demostrado (Foong, *et al*, 2002). Una de estas teorías establece que el contenido de proteínas, aunque sea en cantidades trazas, es un precursor esencial y un componente significativo del floc. Carter (2006) encontró que los aminoácidos forman más del 30% del floc aislado a partir de azúcar de remolacha y relacionó la formación de floc con niveles de proteínas superiores a 10 mg/kg, sin embargo su conclusión se basó aparentemente en el análisis de muy pocas muestras. Naidoo y Simpson (2004) informaron que en azúcar refinada de caña un nivel de proteínas superior a 2 mg/kg indicaría una alta probabilidad de formación de ABF.

McKee y colaboradores (2010) sugirieron que la relación de absorbancias (AR) definida como la razón de absorbancias a 490 nm medida a pH = 9 y a pH = 3 está relacionada con ABF. Los autores establecieron que $AR \leq 2$ y $AR \geq 3,2$ representaba los rangos de azúcar floc negativo (f-) y floc positivo (f+), respectivamente. Para azúcares con valores de AR comprendidos entre ambos límites, la predicción de formación de flóculos no era confiable.

Coronel *et al* (2010) y Ruiz *et al* (2013), empleando una metodología recomendada por un productor de bebidas carbonatadas, basada en la medición de absorbancia a 420 nm de una solución azucarada de 50°Bx a la que previamente se le adicionó etanol, determinaron que una lectura mayor a 0,14 UA, utilizando una celda de 5 cm de paso óptico, es un indicador que el azúcar puede ser f+. Comparando esta metodología con la técnica oficial ICUMSA (2009), estos autores encontraron una probabilidad alta (88%) de coincidencia en azúcares f+. Para azúcares de menor calidad, la semejanza entre los dos métodos fue menor (77%). No obstante, para azúcar refinado el método también dio un porcentaje bastante alto de falsos negativos. Obviamente, como éste método es una variación del método de "Haze" para dextranas, la correlación relativamente buena con el método oficial confirma el rol significativo que juegan los polisacáridos en la formación de ABF.

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la relación existente entre la concentración de proteínas y la formación de flóculos como así también comparar el

método de razón de absorbancias con el oficial dado por ICUMSA, en muestras de azúcar empleadas por la industria argentina de bebidas carbonatadas. El análisis de ABF fue extendido para jugos clarificados usando una metodología análoga a la empleada para azúcares blancos con el objeto de determinar si existe relación en la formación de flóculos, entre la calidad de la materia prima y el tipo de clarificación del jugo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El jugo clarificado se obtuvo a partir de muestras de cañas de azúcar cultivadas en parcelas experimentales de la EEAOC y cortadas a mano. La mitad de éstas fueron despuntadas y quitadas las hojas y al resto se dejaron hojas y despunte (trash). El jugo se extrajo de las cañas limpias y con trash mediante prensa hidráulica con una presión de 230 kg/cm² durante 1 minuto. Esto se realizó para caña fresca y estacionada. Se organizaron dos pruebas de una semana de estacionamiento con caña muestreada cada 2 días. El jugo se clarificó inmediatamente por sulfitación (agregando SO₂ hasta pH 4, lechada de cal hasta pH 7, calentamiento y decantación) y carbonatación (añadiendo lechada de cal hasta pH 9,5; CO₂ hasta pH próximo a 6,5; calentamiento y decantación).

Como referencia, se trataron muestras de azúcar siguiendo la metodología ICUMSA (ICUMSA, 2009). Las muestras de jugo clarificado se analizaron de manera similar; mezclándose, en un tubo de ensayo, 10 ml de jugo clarificado fresco con 50 ml de una solución de 65°Brix preparada con un azúcar refinado de alta calidad y comportamiento f-. El brix final de la mezcla del jugo clarificado con la solución de azúcar refinada estuvo dentro del rango requerido por el método oficial, y la pureza próxima a 99,5, por debajo de la pureza de la mayoría de los azúcares blancos comerciales.

Con el objetivo de proveer medidas alternativas de ABF en jugo clarificado se desarrollaron dos métodos: En el primero, se midió la absorbancia a 420 nm de la mezcla jugo/azúcar acidificada a pH 1,5 en cubeta de 5 cm de paso óptico, inmediatamente después de la acidificación (Ac₀) y al décimo día (Ac₁₀). La solución se filtró primero a través de una membrana de nitrato de celulosa de 8 µm para eliminar cualquier partícula que pudiera interferir con la medida de absorbancia. Antes de la lectura, la solución se agitó suavemente por inversión del tubo de ensayo para homogeneizar el líquido, evitando romper cualquier floc que se pudieran haber formado. La diferencia entre las dos lecturas:

$$D_{ac} = A_{ac0} - A_{ac10}$$

se tomó como una medida de ABF. Para el segundo método, se adicionó a 10 ml de la mezcla de azúcar - jugo

clarificado, 10 ml de agua desionizada y 25 ml de etanol al 96-98% en un tubo de ensayo. Como en el método ácido, previa adición de alcohol etílico, se filtró por membrana de 8 µm. Se preparó un blanco reemplazando el volumen de etanol por el mismo volumen de agua. La diferencia entre las dos medidas de absorbancias (a 420 nm y en celda de 5 cm), a temperatura ambiente:

$$D_{et} = A_{et} - A_{et0}$$

se tomó como otra medida alternativa de ABF.

Se realizó el análisis de proteínas cumpliendo con las recomendaciones publicadas (Bio-Rad, 2012). El análisis de las muestras y la curva de calibración se realizaron con niveles de azúcar comparables ya que la sacarosa podría afectar a la lectura (Sigma-Aldrich, 2004). Las soluciones de azúcar refinado se analizaron al 50% y las de azúcar crudo al 20%. Para la cuantificación de proteínas en jugos se realizó una calibración con agua (0% de sacarosa) y los jugos clarificados se analizaron luego de una dilución 5x. Las curvas de calibración para análisis de muestras de azúcar se construyeron usando sacarosa de grado reactivo (Merck Millipore, grado bioquímico).

El método AR en azúcar refinado se analizó según lo informado por McKee *et al* (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de proteínas:

En la calibración del método se obtuvo una ecuación cuadrática (Figura 1) de la forma:

$$P = a(A_{neta})^2 + b(A_{neta}) + c$$

que ajusta adecuadamente los datos sobre el rango cubierto de absorbancias netas. En la ecuación; P es la concentración de proteínas en mg/l. La misma expresada en mg/kg de muestra se calculó a partir de la densidad de la solución diluida. La calibración coincidió bastante bien (no se muestra) con los datos dados por Naidoo y Simpson (2004).

Las calibraciones hechas a concentraciones de sacarosa entre 0% y 50% no mostraron ningún efecto significativo de la sacarosa sobre la forma de la curva de calibración.

El pequeño intercepto (negativo) con la ordenada de la curva de concentración de sacarosa de 50%, podría deberse a trazas de proteínas en el azúcar utilizado en la calibración. Para confirmar esto, se trató la solución estándar de sacarosa al 50% con carbón activado en polvo al 1%, realizándose la determinación de proteínas antes y después del tratamiento (Tabla 1). Para calcular el contenido real de proteínas de una muestra, la diferencia de proteínas promedio (0,7 mg/kg) se adicionó al nivel de proteínas calculado a partir de la curva de calibración de la Figura 1. De esto resultó que el contenido de proteínas en el azúcar estándar (antes del tratamiento con carbón activado) fue de 0,6 mg/kg.

Durante el desarrollo del método se llevaron a cabo una serie de pruebas con soluciones de jugos clarificados filtrados con membrana de nitrato de celulosa de 0,45 µm ó 8 µm antes del análisis de proteínas. Se encontró que cerca del 50% de las proteínas fueron removidas con la

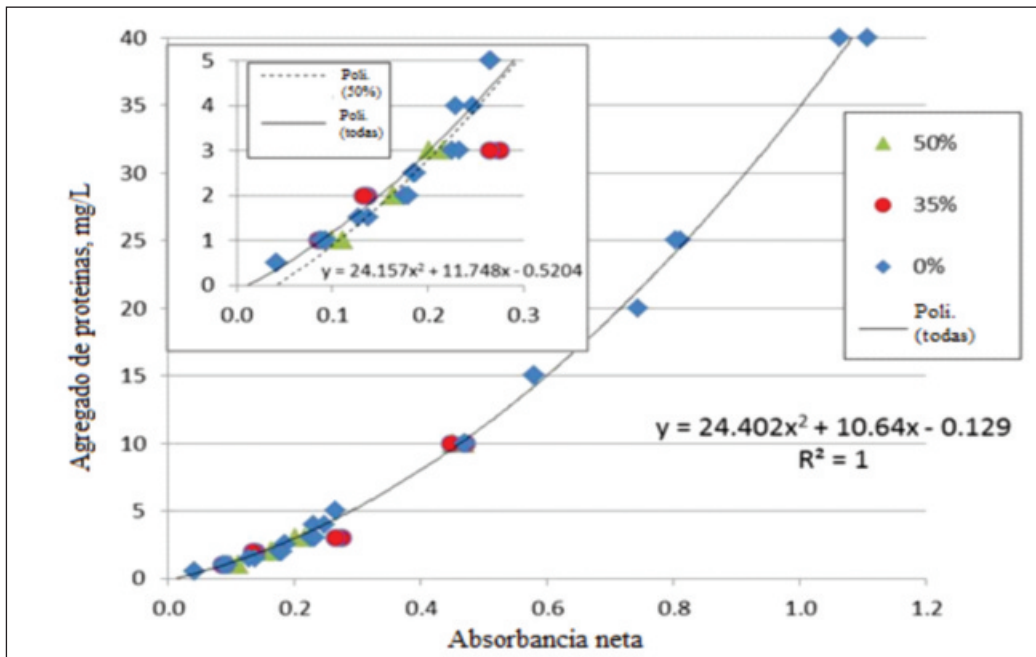


Figura 1: Curvas de calibración de proteínas a distintos niveles de sacarosa.

Tabla 1: Análisis por triplicado de proteínas en una solución estándar de sacarosa al 50% antes y después del tratamiento con carbón activado.

	Concentración de Proteínas (mg/kg)		
	A_{neta}	Aparente	Corregida
Antes del tratamiento	0,0239	-0,2	0,5
	0,0354	-0,1	0,6
	0,0475	0,1	0,8
Después del tratamiento	-0,0244	-0,8	-0,1
	-0,0151	-0,7	0
	-0,0134	-0,7	0

membrana de poros mayores y más del 80% con la de poros de menor tamaño. Esto se debe a la fuerte afinidad de las proteínas por el nitrato de celulosa, por lo que debe evitarse la filtración de la muestra con este tipo de membrana antes de realizarse el análisis.

Proteínas y ABF en azúcar refinada:

Una refinería argentina (A) procesa un azúcar crudo de alrededor de 300 IU de color producida con un jugo clarificado por sulfitación con aproximadamente 300 mg/L de SO₂. El proceso de refinamiento involucra únicamente una redisolución del azúcar y una filtración con un ayuda filtrante de partículas de tamaño fino y medio. El azúcar de esa planta, analizada en el laboratorio de la EEAOC nunca resultó f+. Otra refinería (B) procesa un azúcar crudo con una calidad similar pero por fosfoflotación, tamización a través de un lecho de arena para prevenir el arrastre de espuma y decoloración con resinas de intercambio iónico. Aunque el proceso carece de una filtración fina, el azúcar refinado es de excelente calidad, cumpliendo con todas las especificaciones de las

embotelladoras. Sin embargo, se encontró que frecuentemente resultó f+. Se recolectaron muestras de azúcar refinado y, en menor cantidad, de azúcar crudo durante agosto y septiembre del 2012; se analizó el contenido de proteínas (Figura 2) y, en algunos casos, el ABF por la metodología oficial con el fin de reunir datos más amplios sobre la producción de azúcar refinada por ambas fábricas.

En la Tabla 2 puede observarse que el nivel de proteínas promedio en la refinería A era, en realidad, más alta que en la refinería B, sin embargo 4 de 20 (20%) muestras de azúcar refinado de la refinería A resultaron f+. En cambio, en la refinería B, 17 de las 20 (80%) muestras azúcar refinada dieron como resultado f+, con niveles de

Tabla 2: Niveles de proteínas en mg/kg en azúcar refinado de las refinерías A y B.

	Promedio	Desviación estándar
A	2,4	0,7
B	1,0	0,9

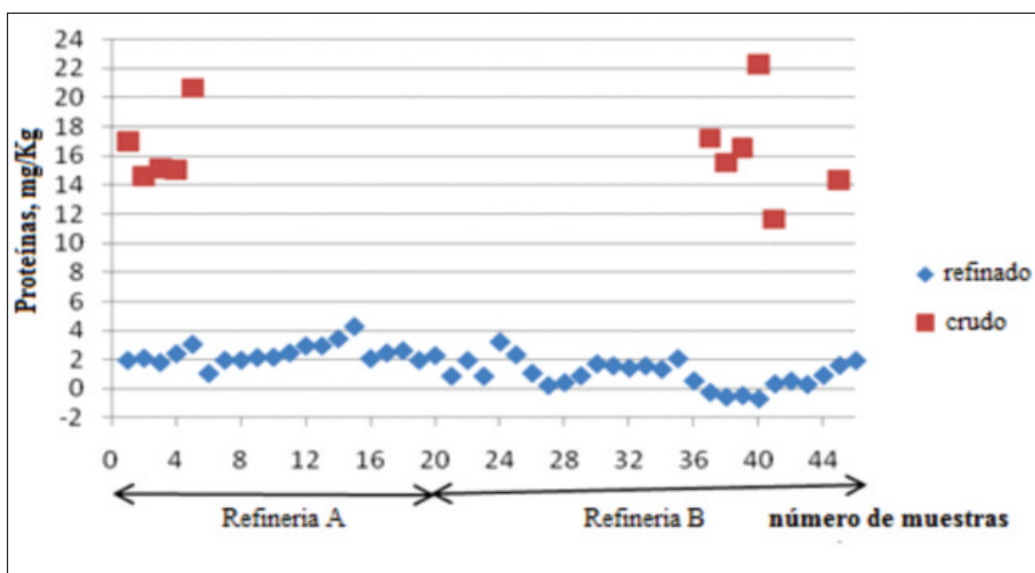


Figura 2: Niveles de proteínas en azúcar refinado y crudo de las refinерías A y B.

proteínas, en promedio, más bajos. Considerando el total de muestras analizadas, las muestras de azúcar con f+ tuvieron, en promedio, un contenido de proteínas levemente más pequeño que los azúcares que resultaron f- (Tabla 3). Estos resultados no confirman el límite informado por Naidoo y Simpson (2004) de 2 mg/kg de proteínas en azúcar de caña refinado, aunque esto de ninguna manera signifique que las proteínas no jueguen un rol en la formación de floc. Es importante destacar que todas las muestras de azúcar crudo analizadas resultaron f+.

Tabla 3: Niveles de proteínas en mg/kg en muestras de azúcar refinado f+ y f-. Conjunto de las refinerías A y B.

	Promedio	Desviación estándar
f+	1,5	1,0
f-	2,1	0,8

Relación de absorbancias:

Se analizaron mediante el método oficial ICUMSA (2009) un grupo de 63 muestras de azúcar refinado y blanco "común", determinándose también la relación de absorbancias (Tabla 4) con el objetivo de estudiar si éste análisis podía ser usado para predecir el comportamiento ABF como se reportó con anterioridad (McKee *et al*, 2010). Más de la mitad de las muestras analizadas (33 de 63) tuvieron resultados comprendidos en el rango medio donde, de acuerdo a los autores, no puede hacerse una predicción. En el rango de valores bajos de AR, que indicaría un comportamiento f-, el mismo número de muestras de azúcar resultaron f+ y f- con la metodología oficial. Solo en muestras de azúcares con $AR \geq 3,2$ (13 de 63), se encontró una probabilidad de más del 90% que el azúcar presente comportamiento f+ con la metodología ICUMSA. En promedio, el valor de AR para las muestras de azúcar f+ y f- fue casi igual; 2,9 y 2,6 respectivamente.

Tabla 4. Porcentaje de muestras f+ y f-, determinadas por la metodología oficial, en cada uno de los tres rangos de AR.

Rango de AR	≤ 2	$> 2 \text{ \& } < 3.2$	≥ 3.2
f+	50	39,4	92,3
f-	50	60,6	7,7

Tabla 5: Concentración de proteínas (mg/L) en jugos clarificados por sulfitación y carbonatación, producidos a partir de caña limpia y caña con trash

Método de clarificación	Tipo de caña	Promedio	
Sulfitación	Sin trash	77	33
	Con trash	103	48
Carbonatación	Sin trash	165	48
	Con trash	192	51

En base a estos resultados podría concluirse que el valor de AR no representa una forma útil de predecir ABF, aunque un valor de $AR \geq 3,2$ sugiera una alta probabilidad de que la muestra presente comportamiento f+.

ABF en jugos clarificados:

Se prepararon aproximadamente 100 muestras de jugos clarificados de acuerdo a las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos, determinándose en ellos los niveles de proteínas y los parámetros D_{et} y D_{ac} basados en la absorbancia con alcohol y ácido. También se realizó el método de los 10 días modificado, como se describió previamente, adoptándolo como referencia del comportamiento floc de un jugo (Tablas 5 y 6).

En promedio, con la sulfitación los jugos clarificados presentaron cantidades significativamente menores de proteínas que aquellos obtenidos por carbonatación, debido a que en este proceso se alcanzan pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas ($pH < 5$). De todas maneras, el mismo porcentaje (31%) de cada tipo de jugos resultaron f+, a pesar del bajo contenido de proteínas en los jugos sulfitados.

En los jugos claros obtenidos de caña con trash los niveles de proteínas fueron más elevados. El trash produjo un leve incremento en la frecuencia de muestras f+ comparado con la caña limpia (32% vs 27%), pero el efecto del estacionamiento de caña sobre la incidencia del floc fue el más obvio, 53% de f+ vs 31% en jugos de caña fresca.

Ambos indicadores alternativos (D_{et} y D_{ac}) cumplen con la tendencia esperada al ser más altos en muestras de jugo de caña con trash, caña estacionada y en jugos f+. De todas formas, los valores absolutos de D_{ac} son pequeños, con desviaciones estándar relativamente altas. El efecto del pH sobre la absorción de la solución se eliminó sustrayendo el blanco. No obstante, cualquier cambio subsiguiente en el pH de la muestra durante los 10 días puede haber comprometido los resultados.

Las muestras fueron filtradas previamente con membrana de nitrato de celulosa, lo que pudo haber eliminado una parte de las proteínas, y, posiblemente, haber disminuido el efecto de las variaciones de las condiciones de la caña.

Tabla 6: Tendencia de jugos clarificados a flocular tal como se determinó con el método modificado de 10 días (f+ o f-) y promedios con sus respectivas desviaciones estándar (entre paréntesis) de las absorbancias netas a partir del test alcohólico (D_{et}) y ácido (D_{ac}).

	f+ (%)	f- (%)	D _{et}	D _{ac}
Sulfitación	31	69	0,407 (0,195)	0,039 (0,092)
Carbonatación	31	69	0,322 (0,175)	0,082 (0,145)
Caña limpia	27	73	0,325 (0,137)	0,052 (0,059)
Caña con trash	32	68	0,383 (0,219)	0,068 (0,152)
Caña fresca	31	69	0,372 (0,160)	0,044 (0,061)
Caña estacionada	53	47	0,453 (0,204)	0,118 (0,191)
f+	--	--	0,526 (0,147)	0,111 (0,197)
f-	--	--	0,287 (0,287)	0,040 (0,040)

De los dos parámetros alternativos, D_{et} es el más robusto (posee coeficientes de variación más pequeños), esto corresponde con la tendencia del jugo a flocular (0,526 para jugos f+ y 0,287 para jugos f-) reflejando, otra vez, el rol importante que juegan los polisacáridos, incluyendo a la formación del floc ácido.

Aunque se hayan hecho muchos esfuerzos en hacer las pruebas lo más representativo posible del proceso de fabricación de azúcar en un ingenio, hay por lo menos dos factores que pueden haber afectado los resultados. Primero, la caña fue cortada a mano, por lo tanto está libre de tierra. Segundo, el jugo se extrajo con doble prensado, con agregado de agua de imbibición antes del segundo prensado; es probable que la extracción de no azúcares fuera más baja que en un ingenio azucarero. A pesar de esto, la gran proporción de jugos clarificados que resultaron f- (50 al 70%) sorprende. En los ensayos de floc, los no azúcares se diluyeron por adición de azúcar refinado f-, con una pureza de la mezcla entre 99,3 y 99,5%, donde la concentración de no azúcares, incluyendo a varios posibles responsables del comportamiento f+, tales como proteínas, sílice, etc., continuaba siendo de 5 a 7 veces más alta que en muestras de azúcar refinado estándar.

CONCLUSIONES

Se encontró que los niveles de proteínas en azúcar refinada de dos ingenios argentinos varían entre 0 y 2,5 mg/kg aproximadamente, aunque según lo determinado con el método oficial ICUMSA, aparentemente no tuvieron relación con el comportamiento floc del azúcar. También se determinó el valor de AR en muestras de azúcares blancos y refinados, pero se encontró que no tenía utilidad como parámetro para predecir la tendencia a la formación de floc ya que se obtuvieron un gran número de falsos negativos. No obstante, se encontró que existe un 90% de

probabilidades de formar ABF en casos de muestras de azúcar que presentan valores de AR $\geq 3,2$.

Los niveles de proteínas encontrados en jugos de caña preparados a partir de caña limpia (sin trash), y clarificados por sulfitación, fueron la mitad de los encontrados en los jugos clarificados por carbonatación, y cerca del 30% más bajo de los jugos preparados a partir de caña con trash. El análisis de proteínas confirmó que las hojas y las puntas de las cañas añaden una cantidad significativa de proteínas al total. A pesar del mayor contenido de no azúcares en las muestras de jugo clarificado, cerca de dos tercios de la totalidad de muestras obtenidas en el laboratorio tuvieron un comportamiento f- con el método modificado de 10 días. El estacionamiento de la caña incrementa la frecuencia de comportamiento f+ en jugos clarificados, según los resultados obtenidos a partir de caña fresca. Adicionalmente, se determinaron dos indicadores alternativos en jugos de caña basados en la absorbancia; D_{et} y D_{ac}, y se encontró que ambos cumplían con la tendencia esperada, al ser mayores en jugos de caña con trash, caña estacionada y en jugos con comportamiento f+.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Lic. Romina Torres y a la Lic. Silvana Nazar de la Sección Química de Productos Agroindustriales por los análisis de proteínas, y al Lic. Fernando Núñez por los análisis de AR.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bio-Rad. (2012).** Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, Hercules, California, USA.
- Carter M. (2006).** UV floc protein method as an indicator of floc risk in white beet sugar. Zuckerindustrie 131(2): 92-97.

- Coronel, M.; S. Bustos; M. Lara; F. Nuñez; V. Gondek; S. Lugli y M. Ruiz. (2010).** Evaluación de dos metodologías para la determinación de floculación en muestras de azúcar. [CD ROM]. Presentado en el XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Técnicos de la Caña de Azúcar (SATCA), realizado en Tucumán los días 29 y 30 de abril de 2010.
- Foong, K. K.; R. Amal ; W. S. Doherty and L. Edye. (2002).** A review on acid beverage floc. *Zuckerindustrie* 127(5): 382-388.
- ICUMSA (2009).** International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis Methods Book. Method GD 2/3-40 10-day acid beverage floc test for white sugar. Verlag Dr. Albert Bartens, Berlin, Germany.
- McKee, M.; R. D. Triche; M. A. Godshall and C. Richard. (2010).** Floc Prediction in Refined White Cane Sugar: The SPRI Rapid Floc Test. Sugar Processing Research Institute, Inc. SPRI Conference, New Orleans, Louisiana, USA.
- Naidoo, S. and R. Simpson. (2004).** The detection of protein in refined sugar. *Proc. S. Afr. Sugar Technol. Ass.*, 78: 569-572.
- Ruiz, M.; M. Coronel; F. Nuñez and M. Saska. (2013).** Investigation of a correlation between the official ICUMSA 10-day acid beverage floc test and a rapid alcohol test for refined and direct white cane sugars [CD ROM]. En: *Proc. ISSCT Congress*, 28, Sao Paulo, Brazil.
- Sigma-Aldrich Inc. (2004).** Technical Bulletin, Bradford reagent.