



# Asociación Argentina de los Químicos y Técnicos de la Industria del Cuero

## Socios Protectores



Adelfa S.R.L.



Buckman Latin America



Colorantes Industriales S.A.



DF Sudamericana S.R.L.



Fast Chemical Oil S.A.



Curtiembre Fonseca S.A.



Gafor Distribuidora LTDA



Juan Naab S.A.I.C.



La Hispano Argentina



Lanxess S.A.



Oselco SH



Pinturas Pasco S.A.



Pellital S.A.



Quimargen S.R.L.



Indunor S.A. / Silva Team



Stahl Brasil S.A.



Técnica Química Argentina S.A.



TFL Argentina S.A.



Uniquim



Units Sudamericana S.A.



Curtiembre Zanin Hnos. SH



Zschimmer & Schwarz Argentina S.A.

# Sumario

Volumen 25 - N° 88 - Mayo 2015

## Editorial / Editorial

- 06 ➤ Editorial de la Presidente  
➤ *Editorial of our President*

- 07 ➤ Carta del Editor  
➤ *Editor's Letter*

## Ciencia y Tecnología / Science and Technology

- 09 ➤ Curtición de Piel de Cabra Empleando Afrecho de Trigo

➤ *Tanning of Goatskin Using Wheat Bran*

**Martegani José, Mazzilli Germán, Núñez Gabriela, Escola Marcos, Esterelles Gabriela, Scelsio Natalia, Bonfranceschi Barros Alfonsina, Markán Alejandro y López Laura M. I., INTI Cueros.**

- 14 ➤ Fogging y Haze: por qué es difícil desarrollar un artículo que cumpla con las especificaciones de todas las automotrices.

➤ *Fogging and Haze ; why it is difficult to develop an article that complies with all specs.*

**Lic. Patricia Casey, Pablo Pignatelli, Leonardo Pileggi Curtiembres Fonseca S.A. – Buenos Aires – Argentina.**

## Congresos / Congresses

- 22 ➤ 10a Conferencia Internacional Asiática en Ciencia y Tecnología del Cuero.

➤ *10th Asian International Conference on Leather Science and Technology.*

- 23 ➤ Invitación a participar en el XXXIII Congreso Internacional de IULTCS.

➤ *Invitation to attend the XXXIII International IULTCS Congress.*

- 24 ➤ Congreso Mundial de Calzado en México 2014.

➤ *The 2014 World Footwear Congress in Mexico.*

## Institutos / Institutes

- 25 ➤ Tecnología y Manufacturas del Cuero. INTI Cueros.

➤ *Technology and Leather Manufactures. INTI Leather.*

➤ Tercer Congreso Internacional de Ingeniería del Cuero.

➤ *The 3rd International Engineering Leather Congress.*

## Reportajes / Report

- 26 ➤ Entrevista al Sr. Silvio Michelin

➤ *Interview Mr. Silvio Michelin*

## Actividades de AAQTIC / AAQTIC's activities

- 29 ➤ Cursos AAQTIC sobre Tecnología del Cuero.

➤ *AAQTIC's Courses on Leather Technology.*

## Interés General / General Interest

- 30 ➤ Producción de Materia Prima Piel y Manufacturas del Cuero.

➤ *Raw Hide Production and Leather Manufactures.*

**Víctor Daniel Vera.**

- 32 ➤ Normas ambientales mínimas aceptables para la Industria del Cuero -Comisión de Medio Ambiente (IUE) del IULTCS

➤ *Minimum Environmental acceptable Standards for tanneries- IULTCS Environmental Commission (IUE)*

## Mundo del Cuero / Leather World

- 34 ➤ CEMCA 75.

➤ *75th CEMCA.*

➤ IFLS+EICI Feria de Cueros y Calzados Bogotá.

➤ *IFLS+EICI Bogotá Leather Fair & Shoes.*

- 35 ➤ Minuta de la reunión de la Comisión IUR.

➤ *Minute of the IUR Commission meeting.*

➤ Premio al Joven Científico del Cuero.

➤ *Young Leather Scientist Award.*

- 36 ➤ Buckman Anuncia Cambio en la Gerencia General para Buckman Cono Sur

➤ *Buckman Announces Change of General Manager for South America*

## Biblioteca / Library

- 37 ➤ Publicaciones recibidas

➤ *Received publications*

- 38 ➤ Libros y revistas

➤ *Books and magazines*

## Ficha Técnica / Technical File

- 47 ➤ Características del cuero para tapicería. Selección de cuero para mobiliario.

➤ *Upholstery Leather Characteristics – Leather Selection for furniture.*



# Curtición de piel de cabra empleando afrecho de trigo en la etapa de purgado. Análisis enzimático, microscópico y físico-mecánico

Martegani José, Mazzilli Germán, Núñez Gabriela, Escola Marcos, Esterelles Gabriela, Scelsio Natalia, Bonfranceschi Barros Alfonsina, Markán Alejandro y López Laura M. I.  
CITEC: Centro de Investigación y Tecnología del Cuero  
Camino Centenario entre calles 505 y 508 C.C. 6 (1897) Manuel B. Gonnet, Provincia de Buenos Aires, Argentina  
E-mail: lmiilopez@yahoo.com.ar

## Abstract

### "Tanning of Goatskin Using Wheat Bran in the Process of Purging"

*In the leather technology the use of enzymes with proteolytic activity in the process of bating allows an appropriate structural relaxation to make a leather pliable. This paper has tested the wheat bran as enzymatic agent in the process of purging. The results establish that should not be separated from the solid material bran because it retains most of the enzymatic activity and therefore the total bran suspension must be in contact with the skin to be treated. This enzyme preparation was able to degrade proteins and casein dust skin substrate but not to elastin. Through microscopy techniques it was evidenced opening (relaxation) and the division of the fibrous bundles in the central part of "corium" in the skin samples subjected to treatment with bran. The organoleptic characteristics of the leathers were better than those who had no enzyme treatment (white), while the physical-mechanical tests showed no significant differences. The use of wheat bran may have relevance for artisanal tanneries to replace imported commercial enzyme preparations and use as a by-product of wheat flour industry.*

**Resumen:** *En la tecnología del cuero el uso de enzimas con actividades proteolíticas en la etapa de "rendido o purgado", permite un relajamiento estructural apropiado para obtener un cuero flexible. En este trabajo se ha ensayado el afrecho de trigo como agente enzimático en el proceso de purgado. Los resultados obtenidos permiten establecer que no debe separarse el material sólido del afrecho porque éste retiene la mayor parte de la actividad enzimática y por lo tanto la suspensión de afrecho total debe estar en contacto con la piel a tratar. Dicha preparación enzimática fue capaz de degradar caseína y las proteínas del sustrato polvo de piel pero no a la elastina. A través de técnicas de microscopía se pudo evidenciar en las muestras de piel sometidas al tratamiento de purga con afrecho una apertura (relajamiento) y la división de los haces fibrosos en la zona central del "corium". Las características organolépticas de los cueros tratados fueron mejores que las de los que no tuvieron el tratamiento enzimático (blancos), en tanto que los ensayos físico-mecánicos de resistencia no mostraron diferencias significativas. El empleo del afrecho de trigo puede tener relevancia para las curtiembres artesanales en reemplazo de preparaciones enzimáticas comerciales importadas y como aprovechamiento de un producto secundario de la industria de harina de trigo.*

## Introducción

Una actividad estrechamente relacionada a la tecnología de proceso para elaborar cueros que satisfaga a los distintos mercados nacionales, es la optimización del proceso de rendido (o purgado). Antes de proceder a la curtición de las pieles es importante eliminar en-



zimáticamente proteínas interfibrilares para lograr una apertura de la estructura fibrosa colagénica que permita que el tejido alcance una movilidad adecuada para conferir al cuero elaborado blandura, elasticidad y resistencia frente a los esfuerzos mecánicos [1]. Caracterizar la actividad de las enzimas proteolíticas potencialmente útiles para dicho proceso es fundamental para mejorar la biocatálisis [2]. Con el uso de enzimas con actividades proteolíticas adecuadas, en el proceso de ‘rendido o purgado’, se logra el apropiado relajamiento estructural en función de las propiedades que debe poseer el cuero elaborado [3, 4]. En el procesamiento de pieles pequeñas, (conejes, caprinas y ovinas), con o sin pelo/lana, y especialmente en la elaboración artesanal y semiindustrializada, se suele emplear un antiguo proceso que utiliza el ‘afrecho o afrechillo’ procedente de la molienda de cereales cuya cáscara es desmenuzada en esta operación. Habitualmente se utiliza el salvado obtenido en la molienda de los granos del trigo.

El proceso de ‘rendido’ tradicional empleando el afrecho incluye como etapa previa la ‘maceración’ del mismo en medio salino, a temperatura moderada y durante 24 horas. Luego se introducen las pieles en este baño y tiene lugar el proceso de purgado propiamente dicho. Resulta necesario optimizar las condiciones operativas, tanto en la etapa de maceración como en la aplicación del mismo en el rendido ya que los resultados son variables y esto cual afecta negativamente la calidad del cuero producido.

En el presente trabajo se estudia el proceso de rendido con afrecho para distintas condiciones de temperatura y relación afrecho/agua, evaluando la actividad proteolítica sobre diferentes sustratos proteicos (caseína, azul de polvo de piel y rojo congo de elastina) y analizando los efectos obtenidos a través de la aplicación de diversas técnicas microscópicas. Asimismo, se estudiará el efecto del proceso sobre las propiedades organolépticas y físico-mecánicas del cuero elaborado.

## Materiales y métodos

### Extractos enzimáticos obtenidos a partir del afrecho de trigo

1. Suspensiones de afrecho al 3% (p/v) en agua con NaCl 1% (p/v) fueron incubadas durante 24hs a 4°C y 37°C, transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a 5000 g durante 30 minutos y se separaron los sobrenadantes para ser analizados.

2. Suspensiones de afrecho al 3%p/v en agua con

NaCl 1%p/v incubadas durante 24hs a 4°C y 37°C.

3. Suspensiones de afrecho al 3% en agua con NaCl 1%p/v. Sin incubación previa.

4. Suspensiones de afrecho al 6% en agua con NaCl 1%p/v. Sin incubación previa.

### Determinación de actividad proteolítica

#### Empleando caseína como sustrato

Para la determinación la actividad se usó caseína como sustrato [6]. Se preparó una solución de caseína 1%p/v en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) con cisteína 10 mM. La reacción se llevó a cabo en un baño termostatzado a 37°C con agitación orbital,  $\omega = 75\text{rpm}$ . La mezcla de reacción se preparó agregando 25ml de solución de caseína a 5ml de muestra. Luego de incubarse durante 60min en baño termostático, la reacción se detuvo por el agregado de 45ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%p/v.

Los ensayos en blanco fueron realizados inactivando la enzima con TCA previo al agregado del sustrato. Finalmente se centrifugó a 4000 g durante 20min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280nm. Se define la “unidad de actividad Ucas” como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio en 0,001 unidad de Abs280 por hora.

#### Empleando azul de polvo de piel (HPA) como sustrato.

Se pesan en un tubo de ensayo exactamente 25mg del sustrato azul de polvo de piel (SIGMA) a los que se adicionan 10ml de buffer Tris (tris hidroximetil aminometano) 100mM/ HCl ajustado a pH 8,5 y 500 $\mu\text{l}$  de muestra. Se coloca el tubo en un baño termostatzado con agitación continua a 37°C durante un tiempo de 30 minutos. Al cabo de este período se filtra la dispersión se centrifuga y se mide la absorbancia a 595nm. Se realiza también una determinación en blanco (sin afrecho). Cada determinación se efectúa por triplicado. Se define la “unidad de actividad HPA - UHPA” como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio en 0,001 unidad de Abs595 por hora [7].

**Empleando rojo de elastina como sustrato.** El protocolo de análisis para la utilización del sustrato rojo de elastina (SIGMA) es similar al empleado para el sustrato HPA, pero el tiempo de reacción fue de 3 horas y la absorbancia se midió a 495nm. Se define la “unidad de actividad elastina UE” como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, produce un cambio en 0,001 unidad de Abs495 por hora [8].

### Proceso de curtido

**Remojo** (M/V = 1/20). Las pieles de cabra conser-



vadas por secado fueron sumergidas durante 24hs y a 25°C en un baño que contenía NaCl (10g/L), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 g/L), bactericida (1,5 g/L) y detergente (1,5 g/L); °Be: 1,5 y pH 9,0; con agitación suave y periódica. Luego se escurrió el baño.

**Depilado** (M/V = 1/10). Se llevó a cabo empleando una serie de tratamientos secuenciales: Na<sub>2</sub>S (6%) y NaSH (2%) durante 60 minutos; Na<sub>2</sub>S (5,5 %) y NaSH (1,5 %) durante 30 minutos; CaO (3%) durante 60 minutos y CaO (7 %) durante 60 minutos. Luego se escurrió el baño.

**Calero** (M/V = 1/10). En esta etapa se utilizó CaO (2%) durante 60 minutos.

**Descarnado**. Se llevó a cabo empleando una en máquina de rodillo.

**Desencalado** (M/V = 1/5): Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, durante 60 minutos (pH 8,0). Una vez finalizada la etapa de desencalado la piel fue fraccionada en 4 partes equivalentes y el proceso se siguió con cada una de ellas por separado.

#### **Purga**

**Purga con afrecho** (M/V = 1/10): se probaron condiciones diferentes:

1- afrecho de trigo 3 % y NaCl 1%p/v, se dejó actuar durante 24hs y 96hs a 35°C.

2- afrecho de trigo 6 % y NaCl 1%, se dejó actuar durante 96hs a 35°C.

**Purga con la preparación comercial** (M'/V = 2/3). Se utilizó una preparación enzimática comercial al 1% en el baño de desencalado y se dejó actuar durante 40 minutos a 35 °C.

**Piquelado** (M'/V = 2/3). Se utilizó ácido glicólico 2% y NaCl 8% durante 24hs a 25 °C, pH final 3,5.

**Curtido** (M'/V = 2/3). En el mismo baño de piquelado se realizó un primer tratamiento de 2hs con Quebracho ATO 5%, Tanigan BN 2%, seguido de un segundo tratamiento de 2hs con la misma proporción de agentes tánicos y el agregado de un 10% de grasa. Luego se agregó NaHCO<sub>3</sub> 1% y biocida 0,5% obteniendo un pH final de 4,2.

Finalmente se dejó escurrir en caballete por 24hs y se secó en toggling a 40°C hasta 22% de humedad.

(M/V: masa de piel seca en Kg / volumen de baño en litros)

(M'/V: masa de piel en tripa en Kg / volumen de baño en litros )

Enzima comercial: Neozym 3P

#### **Ensayos y evaluación microscópica**

**Procesamiento de muestras para obtención de preparados para microscopia óptica**

● Las muestras fijadas en formol buffer se enjuaga-

ron en agua corriente, se deshidrataron en alcohol etílico 70° durante dos días, seguido de tres cambios, de una hora cada uno, en alcohol etílico 90° y tres cambios, de media hora cada uno, en alcohol etílico absoluto. Se aclararon en xilol (tres cambios de media hora). Se impregnaron en parafina (tres cambios de 1 hora cada uno) y los cortes se realizaron con un espesor de 5μ (micrótomo Leitz 1310).

**Coloración Hematoxilina-Eosina**: Se desparafinaron los cortes en xilol, se hidrataron en alcoholes decrecientes hasta llevarlos a agua destilada, se colorearon durante 5' con una solución de hematoxilina de Mayer (Hematoxilina 1g, yodato de sodio 0,2g, ácido cítrico 1g, hidrato de cloral 50g, alumbre de amonio 50g, agua destilada 1000mL), viraje en agua corriente, se contrastaron 2min en solución diaria de eosina-floxina (solución patrón de eosina 100mL, solución patrón de floxina 10mL, alcohol etílico 95° y ácido acético glacial 4mL). Se enjuagaron en agua destilada, se deshidrataron en alcohol 96°, alcohol etílico absoluto y por último se aclararon en xilol. Se montaron con bálsamo de Canadá.

**Procesamiento de muestras para obtención de preparados para microscopia electrónica de barrido**

● Las muestras fijadas en formol buffer se deshidrataron según el siguiente protocolo: Enjuague durante 2hs en buffer fosfato pH 7 (dos cambios), alcohol etílico 30°, dos cambios de 15min cada uno y un tercer tratamiento de 96hs. Posteriormente, alcohol etílico 70° durante 4hs, segundo cambio de 20hs y tercer cambio de 4hs. Luego, alcohol etílico absoluto, dos cambios de 15min y un último cambio de 30min. Seguidamente las muestras se sometieron a secado por punto crítico (Balzers equipment, CP-30) para su observación en alto vacío (microscopio Jeol 6360 LV).

#### **Determinación de parámetros físico-mecánicos**

● Las determinaciones de la resistencia a la tracción y del alargamiento porcentual a la rotura se realizaron de acuerdo al procedimiento CITEC PE-FM-02-09 (Norma IRAM 8511:2006-ISO 3376:2002).

● Las determinaciones de la carga y distensión correspondientes a la rotura de flor y al reventado se determinaron de acuerdo a la norma IRAM 8515 empleando un equipo Lastometer SATRA Modelo STM463

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados de los ensayos de actividad enzimática de las muestras de afrecho revelaron que la actividad es muy baja para la fracción soluble obtenida



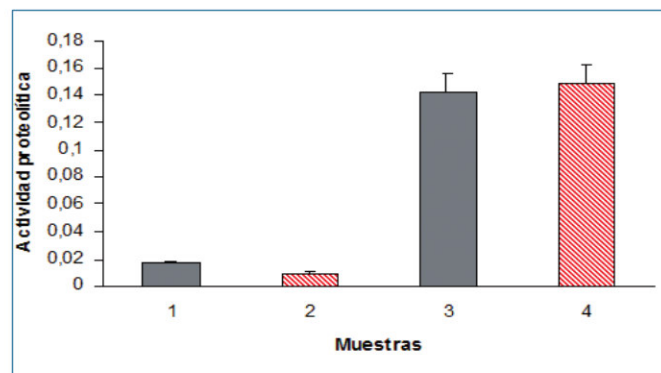
por centrifugación después de dejar en contacto el afrecho con la solución de NaCl al 1%p/v durante 24hs a 4°C ó 37°C. Sin embargo la actividad se incrementó notablemente cuando se trabajó con la suspensión de afrecho total sin eliminar el material sólido, los resultados son mostrados en la Figura 1.

Estos ensayos permiten establecer que no debe separarse el material sólido del afrecho porque éste retiene la mayor parte de la actividad enzimática y por lo tanto la suspensión de afrecho total debe estar en contacto con la piel a tratar.

Por otra parte las determinaciones de actividad enzimática realizados a la suspensión de afrecho después de haber sido incubada por 24hs a 4°C ó 37°C no mostraron diferencias significativas (Figura 1). Cabe consignar que tampoco hubo diferencias entre la actividad medida sin incubación frente a la actividad medida después de 24hs de incubación. Se concluye por lo tanto que no es necesaria una incubación previa del afrecho en agua con NaCl 1%p/v y que la suspensión puede prepararse y aplicarse inmediatamente en la piel a tratar.

La suspensión de afrecho al 3%p/v fue caracterizada en cuanto a su actividad proteolítica empleando tres sustratos diferentes (caseína, rojo congo de elastina y azul de polvo de piel) y comparada con una purga comercial, los resultados se presentan en la Tabla 1. Puede notarse que la suspensión de afrecho es capaz de degradar caseína y las proteínas del sustrato polvo de piel pero no a la elastina, en las condiciones de ensayo. En tanto que la purga comercial muestra mayor actividad proteolítica en todos los casos y este comportamiento justifica que el tratamiento se lleve a cabo en tan solo 40 minutos.

Figura 1



1 y 2: Fracción líquida de la suspensión de afrecho de trigo

3 y 4: Suspensión de afrecho total

Gris: Muestras incubadas a 4°C

Rojo: Muestras incubadas a 35°C

Tabla 1

Muestra	Actividad sobre caseína UCAS	Actividad sobre elastina UE	Actividad sobre polvo de piel UHPA
Suspensión de afrecho 3%p/v	78	No detectable	54
Purga comercial 1%	325	15	289

Las pieles sometidas al proceso de curtido antes descripto fueron evaluadas empleando técnicas de microscopía [9]. Los resultados obtenidos empleando la coloración Hematoxilina-Eosina y microscopía óptica se muestran en la Figura 2. Puede apreciarse una apertura (relajamiento) y división de los haces fibrosos en la zona central del corium tanto en las muestras que fueron sometidas a la acción de preparación enzimática comercial como en las que fueron tratadas con la suspensión de afrecho durante 24hs. Cabe destacar que el tratamiento con la enzima comercial tuvo una acción algo más notoria, en tanto que las muestras correspondientes a los tratamientos con afrecho durante 96hs mostraron una sobreapertura y pérdida de sustancia, por lo que ese tiempo de tratamiento no es recomendable.

Figura 2, coloración Hematoxilina-Eosina (Corium, 400x)

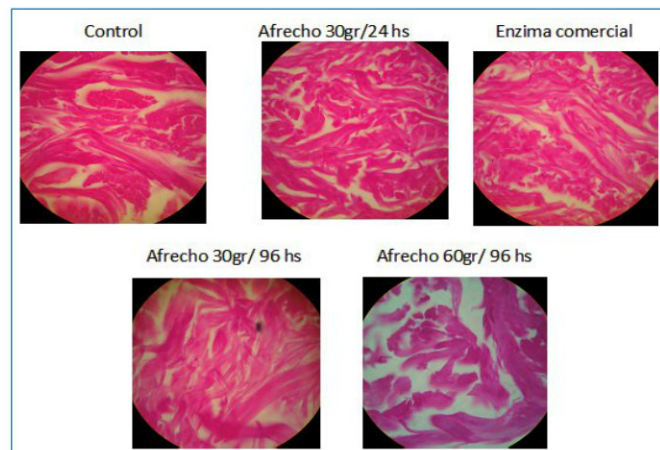
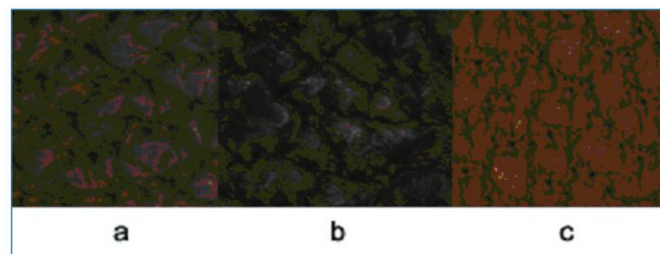


Figura 3, Lupa (Flor, 30x)



En la figura 3 pueden observarse las fotografías obtenidas empleando una lupa binocular de la superficie de los cueros obtenidos utilizando afrecho (30g/24hs), la preparación enzimática comercial y afrecho



60g/96hs. En los dos primeros casos la textura presenta relieves y se nota brillo, en tanto que cuando el tratamiento con afrecho se prolonga por 96hs, se pierde la textura característica y el brillo.

Las muestras fueron también analizadas por microscopía electrónica de barrido, a través de esta metodología pudo observarse con mayor resolución la microestructura de las fibras de colágeno, los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.

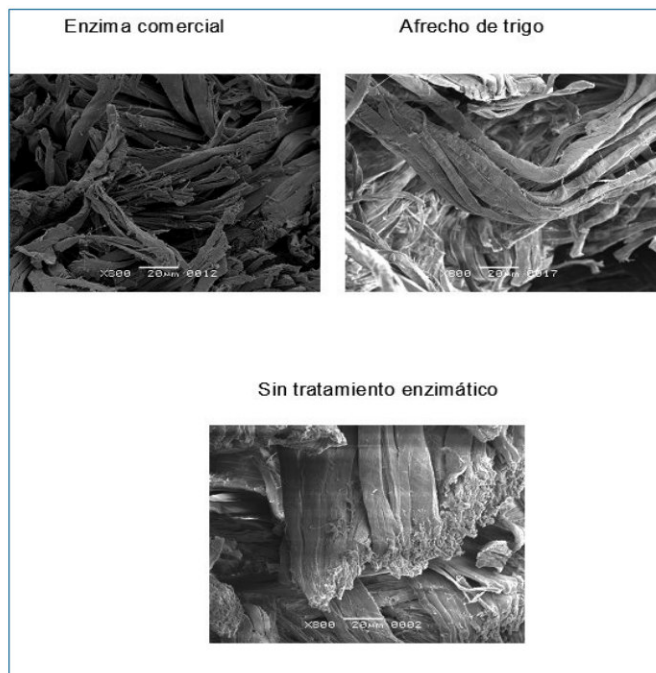


Figura 4, Microscopía electrónica de barrido (Corium, 800x)

	Tratamiento con afrecho a 4°C	Tratamiento con afrecho a 37°C	Blanco
Color	Algo amarillento	Amarillento	Blancuzco
Resorte	Bajo	Bajo	Elevado
Estiramiento	Medio	Medio	Bajo
Quiebre	4,5	4	2

Las características organolépticas de los cueros obtenidos se muestran en la tabla 2, puede notarse una disminución del efecto resorte y más estiramiento en las muestras tratadas con afrecho. El quiebre se mide con una escala que tiene valores que van desde el 1 (menos quiebre) a 8 (mas quiebre), un mayor quiebre se asocia con un mayor efecto de purgado. No se observaron diferencias en cuanto a la temperatura del tratamiento (4°C ó 37°C).

Los resultados de los ensayos físico-mecánicos llevados a cabo se muestran en la tabla 3. Los valores son el promedio de tres determinaciones. No se aprecian diferencias significativas, por lo que podemos concluir que los cueros obtenidos conservan la misma resistencia mecánica que los cueros no sometidos a la acción enzimática del afrecho (blanco).

Muestra	Resistencia a la tracción Orientación paralela (N/mm2)	Resistencia a la tracción Orientación perpendicular (N/mm2)	Alargamiento Porcentual Orientación paralela	Alargamiento Porcentual Orientación perpendicular
Tratamiento con afrecho a 4°C	20	11	22	45
Tratamiento con afrecho a 37 °C	18	11	23	44
Blanco	17	12	25	42

Tabla 3

Por último en la tabla 4 se indican los valores obtenidos para el parámetro distensión al estallido de flor y es el promedio de tres determinaciones. Puede notarse una mayor distensión en el cuero que fue sometido al tratamiento con una enzima comercial o con el afrecho en la etapa de purga en relación al blanco (sin tratamiento enzimático).

Muestra	Distensión al estallido de flor
Afrecho	12,85
Enzima comercial	13,15
Blanco	10,2

Tabla 4

## CONCLUSIONES

La preparación obtenida a partir del afrecho de trigo muestra actividad proteolítica y puede ser utilizada en reemplazo de la preparación enzimática comercial en la etapa de purga si se aplica durante un tiempo prolongado (24hs). No debe separarse el sólido ya que éste contiene inmovilizada a la fracción mayoritaria de la enzima, no es necesaria una etapa previa de incubación y no se observaron diferencias significativas relacionadas con la temperatura de trabajo. Su aplicación tiene relevancia como aprovechamiento de un producto secundario de la industria de harina de trigo para las curtiembres artesanales.

## REFERENCIAS

- 1- Choudhary, R. B., Jana, A. K. and Jha, M. K. Enzyme technology applications in leather processing. Indian Journal of Chemical Technology, v. 11, n. 5, p. 659-671 (2004).
- 2- De Souza F. R. and Gutterres M. Application Of Enzymes In Leather Processing: A Comparison Between Chemical And Coenzymatic Processes. Braz. J. Chem. Eng. Vol. 29, No. 03, pp. 473 – 481 (2012)
- 3- Foroughi, F.T. Keshavarz & Evans C.S. Specificities of proteases for use in leather manufacture. J.Chem.Technol. Biotechnol. 81: 257–261
- 4- Arunachalam, C. & Saritha K. Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry. Indian J. Sci. Technol. 2: 29-32 (2009).
- 5- Bradford, M.B. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).
- 6- Torres M.J., S.A. Trejo, M.I.Martin, C.L. Natalucci, F.X. Avilés and López L.M.I. Purification and characterization of a cysteine endopetidase from Vasconcellea quercifolia A. St.-Hil. latex displaying high proteolytic activity. J. Agric. Food Chem. 58: 11027-11035 (2010).
- 7- Himelbloom, B.H. & Hassan H.M. Optimization of the hide powder azure assay for quantitating the protease of Pseudomonas fluorescens, J. Microbiol. Meth. 4: 59-66 (1985).
- 8- Hamood, A.N., Griswold J & Colmer J. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 64: 3154–3160 (1996).
- 9- Hides, skins, and leather under the microscope. Milton Park, Egham, Surrey: British Leather Manufacturers' Research Association (1957).