

### Effect of different types of thermal pretreatments on the acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to produce reducing sugars

### Efecto de diferentes tipos de pretratamientos térmicos sobre la hidrólisis ácida del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) para producir azúcares reductores

N. LÓPEZ-RAMÍREZ <sup>1\*</sup>, J. E. GUZMÁN-PÉREZ <sup>1</sup>, E. FAVELA-TORRES <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Desarrollo Comunitario, Tecnológico de Estudios Superiores de Chicoloapan. Camino al Monte s/n, esquina con Camino a Tlalmimilolpan, Loma de Guadalupe., 56380 Ejido de Chicoloapan, Méx., Méx.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, 09340 Iztapalapa, México

Sent date: 12/Noviembre/2021, Acceptance date: 25/enero/2022

#### Abstract:

The water hyacinth, like most plants, contains polysaccharides such as cellulose and hemicellulose in its cell wall, which can be hydrolyzed to obtain sugars, which in turn can be used in fermentative processes and produce some biofuels. In this work, the effect of different types of thermal pretreatments to carry out the acid hydrolysis of water hyacinth was evaluated, and it was found that using steam explosion under the addition of sulfuric acid (1.5% w/v), 120 °C, and 1 atm the maximum release of reducing sugars was obtained (324.26 ± 13.4 milligrams/grams of initial dry matter) obtaining 70% more sugars concerning for to the use of a boiling water bath with the addition of acid (1.5% w/v) but at a temperature of 92 °C and a pressure of 0.77 atm.

**Keywords:** water hyacinth, pretreatment, acid hydrolysis, reducing sugars.

---

#### Resumen:

El lirio acuático como la mayoría de las plantas contiene en su pared celular polisacáridos como celulosa y hemicelulosa los cuales, pueden ser hidrolizados para la obtención de azúcares que a su vez pueden ser utilizados en procesos fermentativos y producir algunos biocombustibles. En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes tipos de pretratamientos térmicos para llevar a cabo la hidrólisis ácida de lirio acuático, y se encontró que utilizando la explosión de vapor bajo la adición de ácido sulfúrico (1.5% p/v), 120 °C y 1 atm se obtuvo la máxima liberación de azúcares reductores (324.26 ± 13.4 miligramos/gramos de materia seca inicial) obteniendo un 70% más azúcares con respecto al uso de un baño con agua en ebullición con adición de ácido (1.5% p/v) pero a una temperatura de 92 °C y una presión de 0.77 atm.

**Palabras clave:** lirio acuático, pretratamiento, hidrólisis ácida, azúcares reductores.

---

<sup>1\*</sup> Corresponding author. E-mail: nohemi.lopez@teschic.edu.mx  
Tel. 55-63-15-66-55.

## Highlights

- The water hyacinth is an attractive source of reducing sugars
- The use of acid diluted to 1.5% (w/v) favors the hydrolysis of water hyacinth polysaccharides
- The combination of dilute acid, pressure, and temperature through the explosion of steam increases the concentration of reducing sugars

## Aspectos destacados

- El lirio acuático es una fuente atractiva de azúcares reductores
- El uso de ácido diluido al 1.5% (p/v) favorece la hidrólisis de los polisacáridos del lirio de acuático
- La combinación de ácido diluido, presión y temperatura mediante la explosión de vapor aumenta la concentración de azúcares reductores

# 1. Introducción

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta acuática flotante perteneciente a la familia *Pontederiaceae*. Es una especie tropical originaria de Brasil y posiblemente de otros países de América del Sur, ahora se encuentra en lagos, ríos y pantanos que se mueven lentamente en la mayoría de los países del mundo (Malik 2007; Rezanía *et al.*, 2015). Sin embargo, es considerada como una de las peores malezas acuáticas del mundo, ya que puede cubrir todo un cuerpo de agua formando una alfombra compacta y gruesa en tan sólo 2 o 3 semanas, con una tasa de crecimiento de 220 kg/ha/día (Barua y Kalamdhad, 2017; Bayrakci y Koçar, 2014). Esto ocasiona que se tengan dificultades en el ecosistema acuático, comercio y actividades de entretenimiento (Barua *et al.*, 2018). Por otro lado, las plantas acuáticas tienen muchas ventajas, entre ellas, menor contenido de lignina, no compiten en la producción de alimentos y que pueden ser utilizadas como materia prima (Cheng *et al.*, 2015). Recientemente, la investigación se ha centrado en el uso de biomasa no comestible, entre ellas la hemicelulosa, celulosa, en lugar de la biomasa de primera generación como el almidón (Das *et al.*, 2016). Representando una opción prometedora para la producción de biocombustibles (Ciolacu 218). El lirio acuático es un recurso potencial de biomasa para diferentes usos. Debido a su alto contenido de celulosa y hemicelulosa (30-55% del peso seco) puede proporcionar azúcares fermentables (Bayrakci y Koçar., 2014; Das *et al.*, 2016). Para liberar los azúcares de la pared celular de las plantas, generalmente se aplican pretratamientos. Entre ellos, los pretratamientos con ácido son los métodos más efectivos que se utilizan en el lirio acuático para producir bioetanol, el cual, es un combustible alternativo que se ha vuelto atractivo debido a que es un recurso biológicamente renovable y puede oxigenarse, reduciendo así las emisiones de partículas en los motores de encendido por compresión (Nigam 2002; Kumar *et al.*, 2009; Balat *et al.*, 2008).

Generalmente se aplica ácido diluido bajo temperaturas y presiones altas (Sun y Cheng, 2002; Mishima *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2010). Sin embargo, el conocimiento fundamental de varias tecnologías de pretratamiento puede ayudar a encontrar el mejor método o combinación de pretratamientos para una materia prima de biomasa específica (Rezanía *et al.*, 2017) El objetivo de este estudio fue evaluar la importancia que tiene la aplicación de ácido, temperatura y presión en la hidrólisis de lirio acuático para favorecer la liberación de azúcares reductores.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materia prima

El lirio fue recolectado en el Canal Nacional de Xochimilco en la Ciudad de México, se separó manualmente en hojas, tallo y raíz y se dejó escurrir expuesto al sol por un periodo de aproximadamente 4 h. Posteriormente las fracciones de lirio se colocaron en un secador de charolas a 60 °C por 24 h. El tallo se fragmentó en trozos de 2 - 4 cm para favorecer su secado. Las muestras deshidratadas se conservaron a temperatura ambiente en bolsas de polietileno hasta su uso.

## 2.2. Pretratamiento térmico

### 2.2.1. Explosión de vapor

Se utilizaron 12 tubos con 0.05 g de lirio. A 6 tubos se adicionaron 5 mL de agua destilada y a los otros 6 se adicionaron 5 mL de una solución de ácido sulfúrico 1.5% (p/v). Sólo 6 tubos (3 tubos con agua y 3 tubos con ácido) se colocaron en una autoclave a 1 atm, 120 °C durante 30 min. Transcurridos los 30 min la autoclave se despresurizó rápidamente (< 1 min) abriendo la válvula de purga. Y posteriormente los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionó a cada tubo 5 mL de una solución de NaOH 1.25% (p/v) para neutralizar la concentración de ácido.

### 2.2.2. Baño con agua en ebullición

Se utilizaron 14 tubos con 0.05 g de lirio y se adicionaron 5 mL de una solución de ácido sulfúrico 1.5% (p/v) y fueron incubados en un baño con agua en ebullición (92 °C) y 0.77 atm. Se incubaron durante 30 min y se tomaron 2 muestras cada 5 min. Posteriormente los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionó a cada tubo 5 mL de una solución de NaOH 1.25% (p/v) para neutralizar la concentración de ácido.

## 2.3. Cuantificación de azúcares reductores

Para llevar a cabo la cuantificación de azúcares reductores se utilizó el método de DNS (Miller *et al.*, 1960). Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800 a 640 nm. Se utilizó glucosa 1 g/L como estándar.

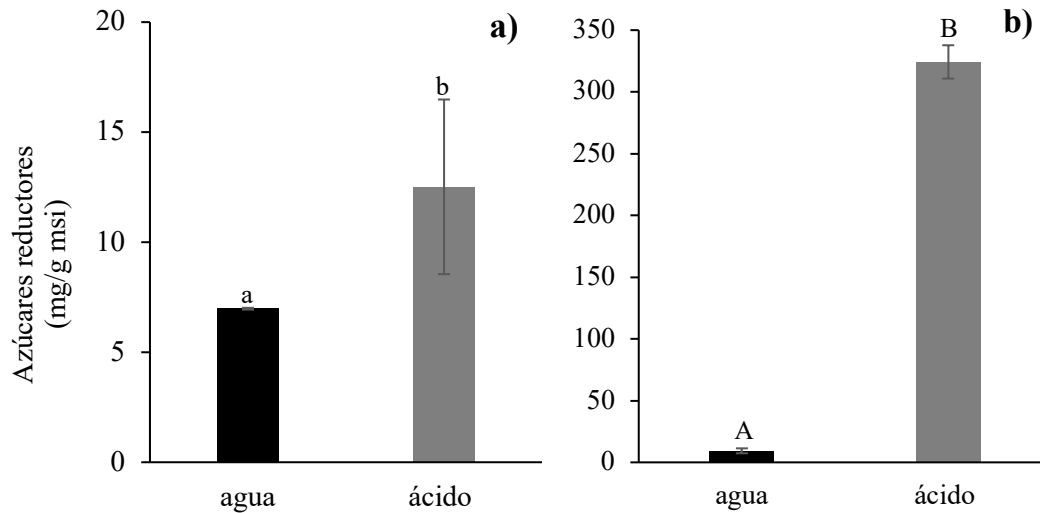
## 2.4. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía y la comparación de medias se realizó mediante pruebas post hoc de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el Software IBM-SPSS 18.

# 3. Resultados y discusión

### 3.1. Efecto de la explosión de vapor en la hidrólisis de lirio acuático

La importancia de adicionar ácido diluido y aplicar la explosión de vapor en la hidrólisis de lirio acuático para la obtención de azúcares reductores se observa en la Figura 1. Donde, en las muestras tratadas con ácido y agua sin explosión de vapor (Fig. 1a) se liberaron únicamente 6.9 y 12.5 miligramos de azúcares reductores por gramo de materia seca inicial (mg az-red/g msi) respectivamente. Sin embargo, al aplicar la explosión de vapor (Fig. 1b) hubo un aumento significativo principalmente en las muestras con ácido, ya que hubo un incremento de hasta 26 veces más, liberando  $324.26 \pm 13.4$  mg az-red/g msi con respecto a los azúcares liberados sin explosión. Por otro lado, al aplicar explosión de vapor a las muestras sólo con agua se obtuvo únicamente un incremento de 1.3 veces.

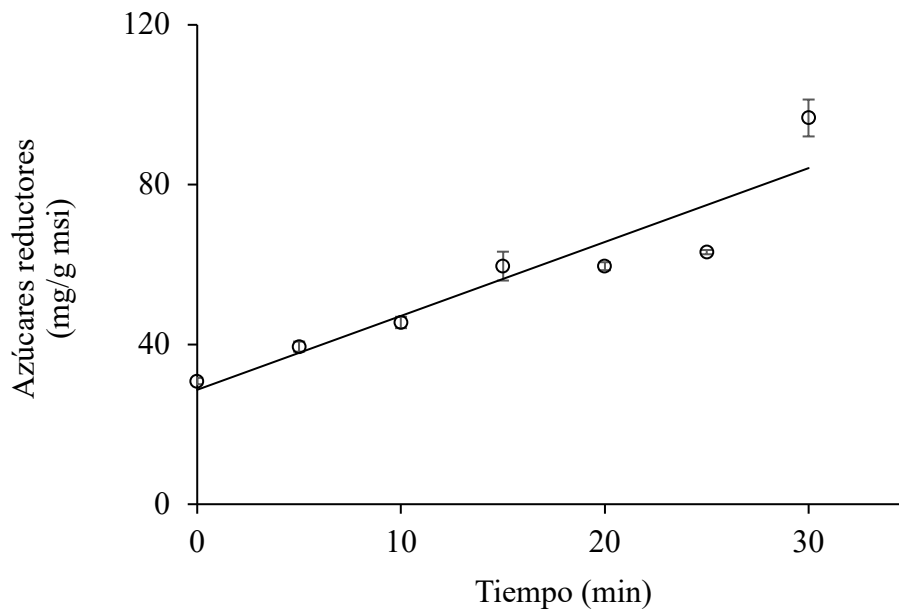


**Figura 1.** Liberación de azúcares reductores de lirio acuático en muestras tratadas solo con agua y solo con ácido sulfúrico 1.5 % p/v. a) sin explosión de vapor y b) con explosión de vapor (1 atm, 120 °C, durante 30 min). Los datos con diferente letra por columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Tanto la adición de ácido, como la explosión de vapor resultaron importantes para la aplicación en la hidrólisis de lirio y esto se debe a que la combinación aproxima a una hidrólisis completa de la hemicelulosa, modificando la estructura de la biomasa lignocelulósica. Además, los ácidos diluidos tienen la capacidad de disminuir el tiempo de reacción (Brodeur *et al.*, 2011).

### 3.2. Efecto del uso de un baño con agua en ebullición sobre la hidrólisis de lirio acuático

En la Figura 2 se muestra la cinética de azúcares reductores liberados con respecto al tiempo obtenidos mediante el uso de un baño con agua en ebullición donde se observó que a los 30 min se alcanzó la mayor liberación de azúcares reductores, obteniendo  $96.69 \pm 4.62$  mg de az-red/g msi, sin embargo, la tendencia aún siguió en aumento, es decir, 30 min de reacción bajo esas condiciones (92 °C y 0.77 atm) no fueron suficientes para liberar la máxima cantidad de azúcares, o bien, se debió prolongar el tiempo de incubación por más tiempo ya que la reacción bajo estas condiciones probablemente fue más lenta.



**Figura 2.** Liberación de azúcares reductores en función del tiempo, en baño con agua a 90 °C, 1.5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p/v), 0.77 atm y 30 min.

Boontum *et al.* (2019) evaluaron la composición de lirio acuático (celulosa, hemicelulosa y lignina) con ácido sulfúrico diluido (2% v/v), a diferentes tiempos (30 y 60 min) y diferentes temperaturas (60, 80 y 100 °C) en un baño con agua y observaron que, conforme se aumentó la temperatura y tiempo de reacción la cantidad de hemicelulosa disminuyó y la cantidad de celulosa aumentó es decir que, se obtuvo una mayor hidrólisis de la hemicelulosa dejando a la celulosa más accesible a las enzimas. Del mismo modo Jung y Kim, (2015) han mencionado que el ácido sulfúrico diluido es conocido como el catalizador más probado para realizar la hidrólisis ácida. Puesto que la hidrólisis con ácido diluido normalmente se realiza entre los 120 - 215 °C con concentraciones de 0.5 - 5% de ácido por debajo de 10 atm durante algunos minutos. Estas condiciones permitieron la hidrólisis casi completa de la hemicelulosa más del 90% de ésta se solubiliza en forma de azúcares monoméricos u oligoméricos, además, de obtener una solubilización parcial de la celulosa.

## 4. Conclusiones

La selección y aplicación adecuada de un pretratamiento para llevar a cabo la hidrólisis de lirio acuático como la explosión de vapor (120 °C, 1 atm), con ácido sulfúrico diluido (1.5% p/v) favoreció la obtención de azúcares reductores hasta un 70% con respecto a la hidrólisis ácida bajo condiciones de temperatura y presión más bajas (baño con agua en ebullición 92 °C, 0.77 atm). Así, el lirio acuático resultó ser una alternativa prometedora para la obtención de azúcares reductores, dando oportunidad de continuar en la búsqueda de mejorar las condiciones de hidrólisis e incrementar la concentración de azúcares para posibles usos fermentativos en la producción de biocombustibles.

## 5. Declaraciones

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## 6. Referencias

- Balat M, Balat H, Öz C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in energy and combustion science* 34(5): 551-573. doi: /10.1016/j.pecs.2007.11.001.
- Barua V B, Kalamdhad A S. (2017). Effect of various types of thermal pretreatment techniques on the hydrolysis, compositional analysis and characterization of water hyacinth. *Bioresource Technology* 227:147-154. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.036.
- Barua V B, Goud V V, Kalamdhad A S. (2018). Microbial pretreatment of water hyacinth for enhanced hydrolysis followed by biogas production. *Renewable Energy* 126:21-29. doi: 10.1016/j.renene.2018.03.028.
- Bayrakci A G y Koçar G. (2014). Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 30: 306-316. doi: 10.1016/j.rser.2013.10.011.
- Boontum A, Phetsom J, Rodiahwati W, Kitsubthawee K, Kuntothom T. (2019) Characterization of diluted-acid pretreatment of water hyacinth. *Applied Science and Engineering Progress* 12(4): 253-263. doi: 10.14416/j.asep.2019.09.003.
- Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran K B, Ramakrishnan S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research* 2011:1-17. doi:10.4061/2011/787532.
- Cheng Y S, Chen K Y, Chou T H. (2015). Concurrent calcium peroxide pretreatment and wet storage of water hyacinth for fermentable sugar production. *Bioresource technology* 176: 267-272. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.016.
- Ciolacu D E. (2018). Biochemical modification of lignocellulosic biomass. En: Popa V y Volf I. (eds) *Biomass as renewable raw material to obtain bioproducts of high-tech value*. Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp 315-35.

- Das A, Ghosh P, Paul T, Ghosh U, Pati B R, y Mondal K C. (2016). Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). 3 Biotech 6:1-9. doi: 10.1007/s13205-016-0385-y.
- Jung H Y. y Kim H K. (2015). Acidic pretreatment. En: Pandey A, Negi S, Binod P, Larroche C (eds) Pretreatment of biomass. Elsevier, Amsterdam, Holanda, pp. 27-50. doi: 10.1016/B978-0-12-800080-9.00003-7.
- Kumar S, Singh S P, Mishra I M, y Adhikari D K. (2009). Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. Chem Eng Technol 32(4):517-526. doi: 10.1002/ceat.200800442.
- Ma F, Yang N, Xu C, Yu H, Wu J, y Zhang X. (2010). Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. Bioresource technology 101 (24):9600-9604. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.084.
- Malik A. (2007) Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth. Environment International 33(1):122-138. doi: 10.1016/j.envint.2006.08.004.
- Miller G L, Blum R, Glennon W E y Burton A L (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. Analytical Biochemistry 1(2):127-132. doi: 10.1016/0003-2697(60)90004-X.
- Mishima D, Tateda M, Ike M, y Fujita M. (2006). Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. Bioresource technology 97(16):2166-2172. doi: 10.1016/j.biortech.2005.09.029.
- Nigam J N. (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. Journal of Biotechnology 97(2):107-116. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00013-5.
- Rezania S, Din M F M, Mohamad S E, Sohaili J, Taib S M, Yusof M B M y Ahsan A (2017). Review on pretreatment methods and ethanol production from cellulosic water hyacinth. BioResources 12(1):2108-2124. doi: 10.15376/biores.12.1.
- Rezania S, Ponraj M, Talaiekhosani A, Mohamad S E, Din M F M, Taib S M, y Sairan F M. (2015). Perspectives of phytoremediation using water hyacinth for removal of heavy metals, organic and inorganic pollutants in wastewater. Journal of environmental management 163:125-133. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.08.018.

Sun Y, y Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology* 83(1):1-11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.