



SHORT COMMUNICATION



Release of reducing sugars from water hyacinth by thermochemical and enzymatic hydrolysis

Liberación de azúcares reductores a partir de lirio acuático por hidrólisis termoquímica y enzimática

Jessica E. Guzmán-Pérez¹, Oscar J. Salinas-Luna¹, Ernesto Favela-Torres², Nohemi López-Ramírez^{1*}

¹División de Desarrollo Comunitario, Tecnológico de Estudios Superiores de Chicoloapan, Estado de México.

²Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Ciudad de México.

*Corresponding author: nohemi.lopez@teschic.edu.mx

Article history:

Received: 27 October 2020 / Received in revised form: 16 December 2020 / Accepted: / 19 December 2020 / Published online: 1 January 2021.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.1.156>

ABSTRACT

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) is considered a pernicious herb in many parts of the world due to its rapid growth. However, for its high content of cellulose and hemicellulose, it could be considered as raw material to produce fermentable sugars. In this work, the effect of sulfuric acid concentration by thermochemical pretreatment and enzymatic hydrolysis on the release of sugars from water hyacinth was evaluated. Initially, the effect of the sulfuric acid concentration from 1.5 to 9% at 120 °C was evaluated. With 1.5%, the release of reducing sugars was 160 milligrams of reducing sugars per gram of dry matter (mg red-sug/g dm). After the thermochemical pretreatment, the enzymatic hydrolysis with the cellulase complex (NS22086) allowed obtaining a reducing sugars concentration up to 317 mg red-sug/g dm. These thermochemical and enzymatic approaches to recover reducing sugars from water hyacinth is promising and should be evaluated for bioprocess using reducing sugars as the main source of carbon, such as bioethanol production.

Keywords: Water hyacinth, pretreatment, enzymatic hydrolysis, reducing sugars

RESUMEN

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) se considera una hierba perniciosa en muchas partes del mundo debido a su rápido crecimiento. Sin embargo, por su alto contenido en celulosa y hemicelulosa, podría considerarse como materia prima para producir azúcares fermentables. En este trabajo se evaluó el efecto de la concentración de ácido sulfúrico por pretratamiento termoquímico e hidrólisis enzimática sobre la liberación de azúcares del lirio acuático. Inicialmente, se evaluó el efecto de la concentración de ácido sulfúrico de 1.5 a 9% a 120 °C. Con 1,5%, la liberación de azúcares reductores fue de 160 miligramos de azúcares reductores por gramo de materia seca (mg az-red/g ms). Tras el pretratamiento termoquímico, la hidrólisis enzimática con el complejo celulasa (NS22086) permitió obtener una concentración de azúcares reductores de hasta 317 mg az-red/g ms. Estos enfoques termoquímicos y enzimáticos para recuperar azúcares reductores del lirio acuático son prometedores y deben evaluarse para bioprocesos utilizando azúcares reductores como la principal fuente de carbono, tal como la producción de bioetanol.

Palabras clave: Lirio acuático, pretratamiento, hidrólisis enzimática, azúcares reductores

1. INTRODUCCIÓN

El lirio acuático, *Eichhornia crassipes*, es una planta monocotiledónea de agua dulce, perteneciente a la familia *Pontederiaceae* y originaria de Brasil y Ecuador. Es una planta ornamental bien conocida que se encuentra en jardines acuáticos y acuarios. Crece desde unos pocos centímetros hasta aproximadamente un metro de altura. El tallo y las hojas contienen sacos llenos de aire, que le ayudan a flotar en el agua. También se considera una hierba nociva en muchas partes del mundo, ya que crece muy rápido con un tiempo de duplicación de 6 - 18 días obteniendo hasta 60 Kg de lirio por m² y agota de la misma manera los nutrientes y el oxígeno de los cuerpos de agua; lo que, afecta negativamente a la flora y la fauna (Ganguly *et al.*, 2012; Malik, 2007; Reznia *et al.*, 2015); así mismo, su excesiva presencia obstaculiza los ecosistemas acuáticos, el comercio y actividades recreativas de las personas (Barua *et al.*, 2018). La productividad anual del lirio acuático podría alcanzar las 200 toneladas de materia seca por hectárea en aguas eutróficas en las zonas tropicales (Cheng *et al.*, 2015).

La biomasa del lirio acuático está compuesta mayoritariamente por hemicelulosa (48%), celulosa (18%) y lignina (3%) (Nigam, 2002). Aunque la composición de la biomasa del lirio depende de la fracción y edad de la planta, así como la época del año, y la zona geográfica en la que crece, se considera que la biomasa es rica en hemicelulosa y celulosa y presenta bajo contenido de lignina (Aswathy *et al.*, 2010; Tovar-Jiménez *et al.*, 2019). La hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto por pentosas y hexosas, esta composición depende del tipo de vegetación, la hemicelulosa de los árboles suele ser más compleja comparada con la hemicelulosa de plantas y a su vez la composición también depende de la fracción de estas. En plantas, la hemicelulosa suele estar compuesta principalmente por xilosa, arabinosa, glucosa y galactosa.(Schädel *et al.*, 2010; Puls, 1997). La celulosa es un homopolisacárido compuesto por largas cadenas de glucosa. Ambos polímeros pueden ser hidrolizados

en azúcares y ser fermentados en productos como etanol o químicamente convertidos en otros productos (Wyman *et al.*, 2005; Mishima *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009).

La hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica en azúcares requiere un cóctel de enzimas que incluya hemicelulasas y celulasas (Abdullah *et al.*, 2016). Sin embargo, la organización de la estructura lignocelulósica en la planta representa un obstáculo para la hidrólisis enzimática; por eso, se requiere un pretratamiento previo para incrementar la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y la celulosa. El objetivo de un pretratamiento consiste en degradar parcialmente la matriz lignocelulósica para hacer al sustrato más accesible a las enzimas (Varga *et al.*, 2002).

La producción enzimática de azúcares fermentables a partir del material lignocelulósico del lirio acuático es una alternativa novedosa y prometedora para la producción de recursos a partir de la biomasa de plantas acuáticas. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del pretratamiento termoquímico y de la hidrólisis enzimática de los biopolímeros del lirio acuático sobre la liberación de azúcares reductores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

El lirio fue recolectado en el Canal de Cuemanco (Ciudad de México: 19° 17' 10" latitud norte y 99° 06' 04" longitud oeste) en la delegación Xochimilco, se dejó escurrir expuesto al sol por un periodo de aproximadamente 4 h, se separó manualmente en hojas, tallo y raíz. El tallo se fragmentó en trozos de 2 - 4 cm para favorecer su secado. Las fracciones de hojas y tallo se secaron en un secador de charolas a 60 °C por 24 h. Las muestras deshidratadas se conservaron a temperatura ambiente en bolsas de polietileno hasta su uso.

2.2. Pretratamiento

2.2.1. Efecto de la concentración de ácido sobre la liberación de azúcares reductores mediante pretratamiento termoquímico

Para el pretratamiento termoquímico se preparó una solución de H₂SO₄ (J.T. Baker) al 9% (p/v). En tubos de vidrio de 20 mL se adicionaron 0.05 g de lirio finamente pulverizado a los cuales se adicionaron 0.83, 1.25, 1.66, 2.08, 2.5, 2.91, 3.33, 4.15 y 5 mL de ácido sulfúrico para obtener concentraciones de 1.5 a 9% (p/v) mediante la adición de agua para completar un volumen final de 5 mL. Los tubos se calentaron en autoclave (EVAR de 24 L), a 1 atmósfera por 30 minutos; a continuación, la autoclave se despresurizó rápidamente (aprox. 1 min) abriendo la válvula de purga. El contenido de los tubos se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron a cada tubo los mililitros necesarios de solución de NaOH 7.35% (p/v) para neutralizar la concentración de ácido correspondiente en cada dilución (0.83, 1.25, 1.66, 2.08, 2.5, 2.91, 3.33, 4.15 y 5 mL) y se complementó un volumen final de 10 mL con agua. Se ajustó el pH a 5 con H₂SO₄ (9% p/v) o, NaOH (7.35% p/v). Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.5. Hidrólisis enzimática

2.5.1. Efecto de la concentración de enzima sobre la liberación de azúcares reductores

Para realizar la hidrólisis enzimática se utilizó el complejo de celulasas NS22086 (Novozymes) con las siguientes diluciones (4, 16, 64, 265). Se adicionaron 0.1 mL de cada dilución a las muestras pretratadas con ácido sulfúrico 1.5% (p/v), se incubaron a 50 °C, 150 rpm durante 18 h. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

2.6. 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.

2.7. 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

3.1. Efecto de la concentración de ácido sobre la liberación de azúcares reductores mediante pretratamiento termoquímico

La liberación de azúcares reductores bajo las condiciones de hidrólisis (120 °C, 30 min) fue máxima (195 ± 6 mg az-red/g ms) a partir de 3% (p/v) de ácido sulfúrico (Fig. 1). Con 0 y 1.5% (p/v) de ácido sulfúrico la liberación de azúcares reductores representó el 16 y 80% de la máxima obtenida respectivamente.

3.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la liberación de azúcares reductores

Una vez seleccionada la concentración de ácido sulfúrico para el pretratamiento termoquímico (ácido sulfúrico 1.5% (p/v), se evaluó el efecto de la concentración del complejo enzimático en la liberación de azúcares reductores con y sin pretratamiento termoquímico (Fig. 2). Sin pretratamiento termoquímico el aumento en la liberación de azúcares reductores fue de 1.5 veces al aumentar 60 veces la concentración de enzima; sin embargo, con pretratamiento térmico el incremento en la liberación de azúcares reductores fue de 2.5 veces para el mismo incremento (60 veces) en la concentración de enzima.

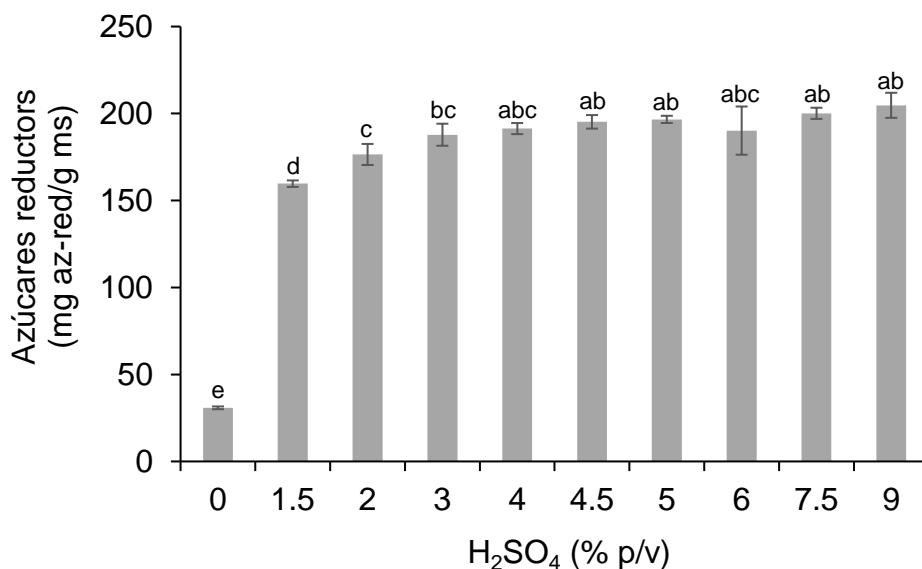


Fig. 1 Effect of sulfuric acid concentration on the release of reducing sugars from water hyacinth by thermochemical pretreatment (120 °C for 30 min).

Fig. 1. Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la liberación de azúcares reductores de lirio acuático mediante pretratamiento termoquímico (120 °C durante 30 min).

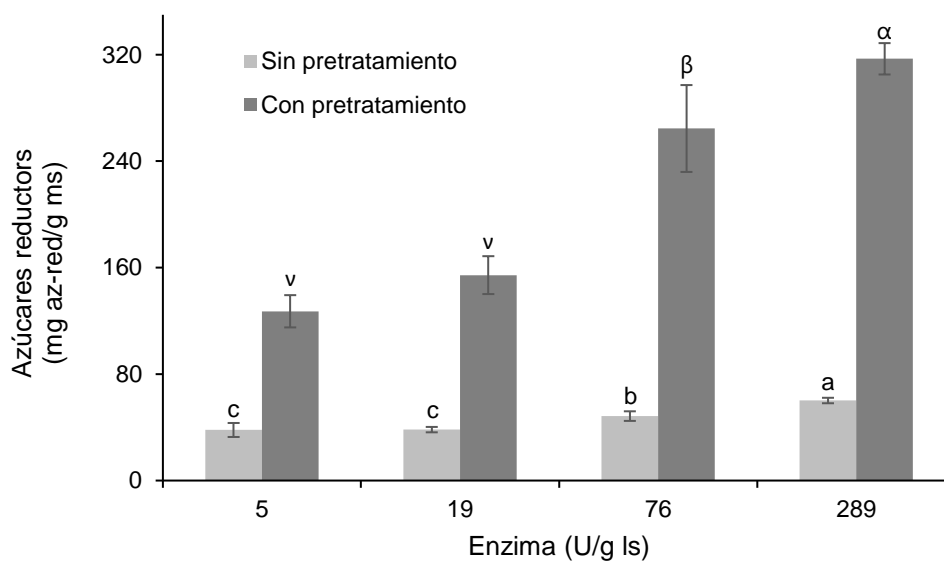


Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of water hyacinth with different dilutions of cellulase complex (NS22086) on the release of reducing sugars at 50 °C, 150 rpm for 18 h. With and without thermochemical pretreatment.

Fig. 2. Hidrólisis enzimática de lirio acuático con diferentes diluciones de complejo de celulasas (NS22086) sobre la liberación de azúcares reductores a 50 °C, 150 rpm durante 18 h. Con y sin pretratamiento termoquímico.

4. DISCUSIÓN

La biomasa vegetal es una fuente renovable de carbono que puede ser utilizado como materia prima para una gran variedad de procesos. En particular, el lirio acuático representa una fuente potencial de materia orgánica susceptible de ser utilizada en diferentes procesos. En este caso, se propuso un bioproceso para el aprovechamiento del lirio acuático para la producción de bioetanol a partir de pentosas y/o hexosas resultantes de la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico del lirio. Los resultados obtenidos mostraron que al incrementar la concentración de ácido de 0 a 3% (p/v) aumentó la liberación de azúcares reductores y que a concentraciones de ácido superiores a 3% (p/v) la liberación de reductores permaneció prácticamente constante. Estos resultados fueron similares a los reportados Reales-Alfaro *et al.* (2013); ellos observaron que a medida que aumentaron la concentración de ácido (1, 2 y 3% v/v), se liberó una mayor cantidad de azúcares, pero se llegó a un punto en el que comenzó a disminuir. Esto lo atribuyeron a que debido al aumento en la concentración del ácido y, a las altas temperaturas (121 - 220 °C) se degradaron especialmente los azúcares de la hemicelulosa, dando origen a dos compuestos derivados del furano: furfural, formado a partir de la degradación de pentosas (xilosa y arabinosa) y 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como resultado de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa) (Balat, 2011). Además, Palmqvist & Hahn-Hägerdal (2000) reportaron que durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos se formó o liberó una amplia gama de compuestos que son inhibidores de microorganismos. Según su origen, los inhibidores suelen ser ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos. Estos compuestos limitan la utilización eficiente de los hidrolizados para la producción de etanol por fermentación. Por otra parte, Mesa *et al.* (2017) reportaron que la eficiencia en la producción de bioetanol se redujo significativamente en presencia de compuestos furfúricos. Reales-Alfaro *et al.* (2013) y Mesa *et al.* (2017) encontraron que las mejores condiciones para realizar un pretratamiento con ácido sulfúrico diluido fueron 2% y 1.5% para lirio acuático y bagazo de caña respectivamente. En este trabajo se encontró que la mayor liberación de azúcares se obtuvo a partir de una concentración del 3%, a concentraciones mayores (4 – 9%) no hubo diferencia significativa, la liberación de azúcares fue casi constante. En ese sentido, se dedujo que no hubo formación de compuestos inhibidores o bien la formación pudo ser mínima, debido a que no hubo una disminución significativa en la liberación de azúcares, lo cual, pudo ser debido a las condiciones utilizadas en este trabajo puesto que, Chandler *et al.* (2012) evaluaron la producción de azúcares fermentables con hidrólisis ácida diluida en dos etapas, donde ellos mencionan que la temperatura tiene un efecto significativo en la liberación de azúcares reductores, evaluaron temperaturas de 100, 120, 140 y 160 °C. Donde, a 160 °C observaron una pérdida de azúcares reductores, la cual pudo estar asociada con reacciones de degradación de azúcares, con la consecuente formación de compuestos inhibidores ya que hubo un aumento en la concentración de estos. Sin embargo, se eligió para la realización de estudios posteriores la concentración de 1.5% ya que la liberación de azúcares a esta concentración sólo tuvo una disminución de aproximadamente el 19% con respecto a la mayor liberación obtenida.

En este trabajo la aplicación del pretratamiento termoquímico con ácido diluido (1.5% p/v) resultó sumamente necesario para mejorar la liberación de azúcares reductores

como complemento de la hidrólisis enzimática, puesto que hubo un aumento del 80% en la liberación de azúcares en las muestras pretratadas con respecto a las muestras sin tratar. Este resultado fue similar al trabajo de Aswathy *et al.* (2010), quienes obtuvieron un 71% de eficiencia en la sacarificación de la biomasa del lirio acuático. Cheng *et al.* (2015) obtuvieron 325 mg de azúcares/g materia seca correspondiente a un aumento del 93%. Sin embargo, ellos utilizaron un pretratamiento alcalino con CaO_2 indicando que hubo una reducción en la lignina mejorando por lo tanto la accesibilidad de las enzimas. En este trabajo se obtuvieron 316.94 ± 11.78 mg az-red/g ms sin necesidad de retirar la lignina de las muestras. El incremento en la liberación de azúcares con la hidrólisis enzimática de las muestras pretratadas fue 5.2 veces mayor que en las muestras sin pretratar. Ma *et al.* (2010) obtuvieron un aumento de 1.34 veces en el rendimiento de azúcares reductores con hidrólisis enzimática de lirio acuático pretratado con ácido diluido (H_2SO_4 al 0.25%). En cuanto a la cantidad máxima de azúcares reductores liberados bajo las condiciones diseñadas en nuestro trabajo resultaron comparables con los obtenidos en trabajos como el de Das *et al.* (2016), quienes obtuvieron un rendimiento máximo de azúcares reductores de 425.6 mg/g a través de la sacarificación de muestras pretratadas con ácido diluido (H_2SO_4 , 2% v/v) a alta temperatura y presión, podemos observar que la cantidad de azúcares fue 1.3 veces mayor que la obtenida en nuestro trabajo, sin embargo, la concentración de ácido que ellos utilizaron fue 2.4 veces mayor que la utilizada en este trabajo (1.5% p/v \approx 0.82% v/v). Por consiguiente, las mejores condiciones para obtener la más alta concentración de azúcares reductores a partir de lirio acuático fue aplicar pretratamiento termoquímico con ácido diluido 1.5% p/v, seguido de la hidrólisis con complejo de celulasas con una concentración de 289 U/g ms. En ese sentido, el lirio acuático es una alternativa en la búsqueda de mejores condiciones para la producción de azúcares fermentables como materia prima para la producción de biocombustibles u otros compuestos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Adbullah J. J., Greetham D., Pensupa N., Tucker G. A. & Du C. 2016. Optimizing Cellulase Production from Municipal Solid Waste (MSW) using Solid State Fermentation (SSF). *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*. 6(3): 1-10. <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000206>.

Aswathy U. S., Sukumaran R. K., Devi G. L., Rajasree K. P., Singhanian R. R. & Pandey A. 2010. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: An evaluation of enzymatic saccharification strategy. *Bioresource Technology*. 101(3): 925-930. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.019>.

Balat M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52(2): 858-875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.028>.

Chandler C., Villalobos N., González E., Arenas E., Mármol Z., Ríos J. & Aiello M. C. 2012. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*. 12(3): 245-253 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=904/90426810002>

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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.016>.

Das A., Ghosh P., Paul T., Ghosh U., Pati B. R & Mondal K. C. 2016. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech*. 70(6): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0385-y>.

Ganguly A., Chatterjee P. K. & Dey A. 2012. Studies on ethanol production from water hyacinth. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(1): 966-972. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.09.018>.

Kumar S., Singh S. P., Mishra I. M. & Adhikari D. K. 2009. Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. *Chemical Engineering & Technology*. 32(4): 517-526. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800442>.

Ma F., Yang N., Xu C., Yu H., Wu J. & 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. <https://doi.org/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): 122-38. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.08.004>

Mesa L., Martínez Y., Barrio E. & González E. 2017. Desirability function for optimization of dilute acid pretreatment of sugarcane straw for ethanol production and preliminary economic analysis based in three fermentation configurations. *Applied Energy*. 198: 299-311. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.03.018>.

Miller G. L., Blum R., Glennon W. E. & Burton A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*. 1(2): 127-132. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(60\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(60)90004-X).

Mishima D., Tateda M., Ike M. & 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. <https://doi.org/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. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5).

Palmqvist E. & Hahn-Hägerdal B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74(1): 25-33. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).

Puls J. 1997. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*. 120(1): 183-196. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200119>.

Reales-Alfaro J. G., Trujillo-Daza L. T., Arzuaga-Lindado G., Castaño-Peláez H. I. & Polo-Córdoba A. D. 2013. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugar. *C.T.F. Ciencia, Tecnología y Futuro*. 5(2): 101-112. <https://doi.org/10.29047/01225383.60>.

Rezania S., Ponraj M., Talaiekhosani A., Mohamad S. E., Md Din M. F., Taib S. M., Sabbagh F. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.08.018>

Schädel C., Blöchl A., Richter A., & Hoch, G. 2010. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant physiology and Biochemistry*. 48(1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.09.008>.

Tovar-Jiménez X., Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T. L., Escalante-Espinosa E., Díaz-Ramírez I., Córdova-López J.A. & Téllez-Jurado A. 2019. Influence of the geographical area and morphological part of the water hyacinth on its chemical composition. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*. 11(1): 39-52. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2017.10.013>.

Varga E., Szengyel Z. & Réczey K. 2002. Chemical Pretreatments of Corn Stover for Enhancing Enzymatic Digestibility. In: Finkelstein M., McMillan J.D., Davison B.H. (eds) *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Applied Biochemistry and Biotechnology. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0119-9_6.

Wyman C. E., Dale B. E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M. R. & Lee Y. Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 96(18): 1959-1966. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.010>.