

# Aprovechamiento de tallos de *Cannabis sativa* por pretratamiento termoquímico e hidrólisis enzimática

## Exploitation of *Cannabis sativa* stems by thermochemical pretreatment and enzymatic hydrolysis

Juan Alejandro Pérez Aguilar<sup>1</sup>, Ricardo Benítez Benítez<sup>2</sup>.

### Resumen

*Cannabis sativa* es una planta ampliamente utilizada en Colombia para propósitos medicinales, lo cual requiere solamente el uso de su flor, generando altas cantidades de tallos residuales. En este estudio, tallos de Cannabis se pretrataron con hidróxido de sodio y con ácido sulfúrico diluidos y su efecto se analizó por espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR). Los sólidos remanentes se llevaron a hidrólisis enzimática usando dos mezclas enzimáticas comerciales: Celluclast 1.5 L y Cellic CTec3; se hizo seguimiento a la producción de azúcares reductores. Los pretratamientos removieron hemicelulosa y lignina, evidenciado por la reducción en las señales en 1734, 1540 y 1240  $\text{cm}^{-1}$ . También ocasionaron un incremento en la cristalinidad de la celulosa. Ambos pretratamientos lograron aumentar la producción de azúcares en la hidrólisis con las dos enzimas trabajadas. Aunque el pretratamiento alcalino fue mucho más efectivo que el ácido y permitió producir hasta 28.59 mg/mL de azúcares con Celluclast 1.5 L y 24.94 mg/mL con Cellic CTec3. El mezclar estas enzimas, usarlas de forma secuencial, o incrementar la carga enzimática no tuvo un efecto sobre la concentración final de azúcares alcanzada.

**Palabras Clave:** azúcares reductores, *Cannabis sativa*, cristalinidad, hidrólisis enzimática, pretratamientos.

### Abstract

*Cannabis sativa* is a widely used plant in Colombia with medicinal purposes, for which its flower is used, generating high amounts of waste stems. In this study, Cannabis stems were pretreated with diluted sulfuric acid and sodium hydroxide and its effect was analyzed by infrared spectroscopy (FTIR-ATR). Remaining solids were submitted to enzymatic hydrolysis using commercial enzymatic mixtures: Celluclast 1.5 L and Cellic CTec3; production of reducing sugars was followed. Pretreatments removed hemicellulose and lignin, as evidence by the reduction in signals at 1734, 1540 and 1240  $\text{cm}^{-1}$ . Increase in cellulose crystallinity was also occasioned. Both pretreatments managed to increase reducing sugars production with the two enzymes used. Although, alkaline pretreatment was much more effective than acid pretreatment and allowed to produce up to 28.59 mg/mL of reducing sugars with Celluclast 1.5 L and 24.94 mg/mL with Cellic CTec3. Mixing these two enzymes, using them sequentially, or increasing enzyme loading did not have an effect on the reached final concentration of reducing sugars.

**Keywords:** *Cannabis sativa*, crystallinity, enzymatic hydrolysis, pretreatments, reducing sugars.

**Recepción:** 22-Noviembre-2022

**Aceptación:** 27-Marzo-2023

<sup>1</sup> Químico, Universidad del Cauca, Maestría en Bioingeniería.

<sup>2</sup> PhD Enzimología, Universidad del Cauca, Departamento de Química.

## 1. Introducción

En los años recientes, con la regulación del uso medicinal de la planta *Cannabis sativa*, el mercado ha crecido rápidamente, tanto a nivel nacional como internacional y se espera que lo siga haciendo en los próximos años. Se espera que alcance un mercado mundial de 166 mil millones USD y en Colombia de 865 millones USD con 449 hectáreas dedicadas a su cultivo [1]. Esta industria genera gran cantidad de residuos verdes (tallos y cortes). Por cada hectárea cultivada, se generan aproximadamente 5.5 toneladas de residuos [2]. Estos residuos generalmente se manejan de formas altamente contaminantes; entre las cuales está la destrucción por incineración, que genera 3000 kg de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por cada kg de desechos [2] y puede causar molestias y olores en comunidades cercanas [3]. Otra opción común es la de llevar los desechos a vertederos, lo que tiene el problema de que el ambiente anaeróbico que genera emisiones de gas metano (CH<sub>4</sub>), un potente gas de efecto invernadero, con un potencial de calentamiento global 25 veces mayor al del CO<sub>2</sub> [4]. Con el crecimiento de la industria del cannabis medicinal y con ella la cantidad de residuos generados, es necesario encontrar formas viables de dar uso a estos residuos sin que se genere contaminación.

Posibles usos de los tallos residuales de cannabis han sido extensivamente investigados y revisados. Entre estas posibilidades está la producción de textiles, papel, materiales de aislamiento y construcción, lechos para caballos, aves de corral y mascotas, así como materiales compuestos en la industria automotriz; y otros productos como maletas, anteojos y accesorios [5–7]. Otro enfoque es la conversión pirolítica a biocarbón, con valiosas propiedades eléctricas, como enmienda para suelos y combustible [8]. Finalmente, se puede aprovechar su alto contenido en polisacáridos para la obtención de distintos productos, principalmente bioenergía en forma de bioetanol [9] y biogás [10]; pero también otros bioproductos como el ácido succínico [11], [12], ácido L-(+)-láctico [13], furfural [14], levoglucosano, levoglucosenona [15] y poli-3-hidroxitirato [16].

Para poder hacer uso de estos valiosos polisacáridos en la obtención de productos, es necesario primero realizar un paso de pretratamiento, que puede ser con álcali, ácido, calor, solventes, irradiación con electrones, molienda mecánica, vapor, microorganismos y sus combinaciones. El pretratamiento es necesario debido a la naturaleza recalcitrante de la biomasa lignocelulósica, por la cual es necesario remover lignina y/o hemicelulosa, mejorando la accesibilidad a la celulosa, con mínima o baja producción de compuestos inhibitorios; logrando una conversión efectiva del cannabis. Seguido a esto se realiza una hidrólisis, generalmente enzimática, convirtiendo los polisacáridos en azúcares libres, disponibles para procesos de fermentación [17], [18]. La aplicación de estos pretratamientos sobre biomasa de cannabis y la posterior hidrólisis han sido ya ampliamente estudiadas y revisadas [17], [19]. Es sabido que los distin-

tos pretratamientos y condiciones de hidrólisis enzimática tienen distintos efectos en la biomasa según factores como genética, ubicación geográfica, condiciones de cultivo, entre otros [20]. Ninguno de estos estudios se ha realizado sobre cannabis de origen colombiano, por lo que en este estudio se evaluó el efecto de pretratamientos y condiciones de hidrólisis enzimática sobre tallos residuales de cannabis medicinal provenientes del departamento del Cauca, Colombia; para la producción de azúcares reductores que posteriormente pueden usarse en la obtención de una variedad de bioproductos.

## 2. Metodología

### 2.1. Materiales y reactivos

La enzima Cellic® CTec3 (Novozymes) fue donada por la Universidad Nacional y Celluclast® 1.5 L (Novozymes) se obtuvo de Univar Solutions. La actividad enzimática se determinó por medio de la metodología del National Renewable Energy Laboratory (NREL) con modificaciones [21]. La actividad de Cellic CTec3 fue de 223 UPF/mL y de Celluclast 1.5 L fue de 67 UPF/mL.

### 2.2. Muestra y preparación

Los tallos residuales de cannabis fueron provistos por la empresa Corporación Flora Vital SAS Zomac (Santander de Quilichao, Colombia). La muestra fue secada a 60 °C durante 5 días, cortada manualmente en trozos de 5 cm aproximadamente y después llevada a un molino eléctrico equipado con un tamiz de 1 mm.

### 2.3. Caracterización de la biomasa

Los sólidos totales se determinaron gravimétricamente mediante secado a 105 °C durante 24 h de 2.0 g de muestra [22]. Las cenizas se determinaron por calcinación a 575 °C durante 8 h [23]. Para determinar los extractivos totales, 2.0 g de muestra se sometieron a extracción Soxhlet con agua durante 8 h, seguido de secado a 105 °C por 24 h. Tras pesar, la muestra se sometió a otra extracción Soxhlet durante 8 h con etanol [24]. Los componentes estructurales se determinaron gravimétricamente según la metodología de detergentes Van Soest [25]. Los componentes no estructurales se eliminaron por digestión con solución de detergente neutro y  $\alpha$ -amilasa. La hemicelulosa se eliminó mediante digestión con detergente ácido y finalmente, mediante digestión con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se eliminó la celulosa. La proteína se determinó por la metodología Kjeldahl (N $\times$ 6.25). Cada determinación fue realizada por triplicado.

### 2.4. Aplicación de pretratamientos

A la muestra se le aplicaron pretratamientos con hidróxido de sodio (NaOH) al 2 % (p/v) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2 % (v/v) en agua.

Se prepararon suspensiones de la muestra al 5% de sólidos en cada solución y se llevaron a un autoclave a 121 °C y 15 psi durante 30 min. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con abundante agua destilada hasta que las aguas de lavado salieran con pH neutro, se secaron a 105 °C durante 12 h, se llevaron a un desecador y se pesaron para determinar el porcentaje de sólidos recuperados.

## 2.5. Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

La muestra pretratada y sin pretratar fueron analizadas por FTIR (*Thermo Fisher Scientific Nicolet™ iS™ 10 FTIR Spectrometer*) con reflectancia total atenuada (ATR). Las condiciones utilizadas para la adquisición de los espectros fueron las siguientes: rango de número de onda 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , resolución 8  $\text{cm}^{-1}$ , número de barridos 32. Cada espectro se recolectado por triplicado, se normalizaron, se promediaron y se les corrigió la línea base. Luego se utilizaron para determinar los cambios en la cristalinidad como el Índice de Orden Lateral (LOI, por sus siglas en inglés), según la ecuación 1. En donde  $A_{1430}$  es la absorbancia a 1420  $\text{cm}^{-1}$  y  $A_{898}$  es la absorbancia a 896  $\text{cm}^{-1}$ .

$$LOI = \frac{A_{1420}}{A_{896}} \quad (1)$$

## 2.6. Hidrólisis enzimática

Para los análisis de cinética de hidrólisis enzimática, se prepararon suspensiones de biomasa pretratada y sin pretratar al 5% en buffer citrato pH 5.0 50 mM, se usó una carga enzimática de 20 UPF/g de biomasa. La reacción se realizó por reflujo a 50 °C, agitación magnética de 75 rpm, durante 72 h. Se tomaron muestras de 1 mL. cada 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. Las muestras fueron centrifugadas y almacenadas a 8 °C hasta su análisis de azúcares reductores, el cual se realizó por espectrofotometría, siguiendo un método colorimétrico basado en una modificación a la prueba cualitativa de Benedict [26]. Se realizaron también pruebas mezclando 10 UPF/g de cada enzima y también hidrólisis en dos pasos, que consistieron en 36 h de hidrólisis con 10 UPF/g de una de las enzimas, separación de los sólidos e hidrólisis en una nueva suspensión con 10 UPF/g de la otra enzima. Finalmente, se realizaron ensayos variando la carga enzimática desde 10 hasta 25 UPF/g. Cada experimento se realizó por duplicado.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Caracterización de la biomasa

La tabla 1 muestra los resultados de la caracterización química de los tallos de cannabis. Se comprueba que la biomasa es alta en contenido de polisacáridos estructurales (57.64%);

valor comparable al que han encontrado otros autores en investigaciones sobre tallos de cáñamo: 58.60% [27] y entre 57.00 y 58.00% [28]. El alto contenido de celulosa es deseable para poder obtener una alta cantidad de glucosa tras la hidrólisis enzimática, que puede ser utilizada para procesos de fermentación. La hemicelulosa es generalmente indeseada, pues reduce la accesibilidad enzimática a la celulosa. Sin embargo, es posible diseñar procesos en los que los azúcares provenientes de la hidrólisis de la hemicelulosa sean utilizados, mediante, por ejemplo, la coproducción de bioetanol y biogás [29], bioetanol y ácido succínico [12], o usando microorganismos modificados para poder fermentar xilosa [30]. El contenido de lignina (14,93%) es más bajo de lo que se reporta en otras investigaciones, usualmente por encima de 20% [27, 31, 32]; aunque sí existen reportes con valores menores como 8.00% [28] y 15.00% [33]. Esta variabilidad puede explicarse por factores como variedad de cannabis [17]. El bajo contenido de lignina encontrado es conveniente, pues su presencia previene la actividad enzimática mediante uniones no productivas [34]. En general, todos los componentes analizados concuerdan con los que ya han sido determinados en tallos de cannabis [28], [31–33].

Tabla 1: Composición de los tallos residuales de cannabis medicinal.

Componente	Contenido (%)
Sólidos totales	88.84 ± 0.29
Cenizas	3.57 ± 0.08
Extractivos totales	24.43 ± 0.34
Hemicelulosa	12.08 ± 0.60
Celulosa	45.56 ± 1.79
Lignina	14.91 ± 0.92
Componentes estructurales totales	72.55
Proteína	4.69 ± 0.20
<b>Total</b>	<b>100.57</b>

### 3.2. Efecto de los pretratamientos termoquímicos

Tras aplicar los pretratamientos ácido y alcalino se recuperaron 52.30% y 64.52% de los sólidos iniciales respectivamente. Es bien conocido el efecto que tienen este tipo de pretratamientos sobre los componentes de la biomasa. Los tratamientos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  resultan en daño a la estructura de la lignina y disolución de la hemicelulosa y los pretratamientos con NaOH solvatan la hemicelulosa y la descomponen hidrolíticamente [35]. Estos cambios en la composición se estudiaron mediante FTIR, la tabla 2 muestra señales importantes que se pueden asociar a los componentes estructurales de la lignocelulosa y los cambios que sufre la intensidad de estas señales en las muestras que han sido sometidas a pretratamiento, con respecto a la muestra sin pretratar. El cambio más notable es la desaparición de la señal en 1734  $\text{cm}^{-1}$ , tanto con el pretratamiento ácido, como con el alcalino. Esta señal está asociada a los enlaces C=O tanto en la hemicelulosa como en la lignina. La desaparición de esta

Tabla 2: Cambios en las señales de los espectros IR de las muestras pretratadas.

Señal (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Pretratamiento ácido	Pretratamiento álcali
3340	Elongación grupos O-H en celulosa y hemicelulosa	Incremento	Reducción
1734	Elongación de grupo C=O en hemicelulosa y lignina	Reducción	Desaparición
1597	Elongación de enlaces C=C en anillos aromáticos de lignina	Reducción	Reducción
1240	Flexión de enlaces C-OH en anillos siringil de lignina y elongación de enlaces C-O de grupos acetilo de hemicelulosa	Reducción	Desaparición
1028	Elongación de enlaces C-OH en celulosa y hemicelulosa	Reducción	Incremento

señal ha sido observada previamente [36] y se asocia a la descomposición de la hemicelulosa con el pretratamiento ácido y la disolución de la lignina con el pretratamiento alcalino. La señal en 1597 cm<sup>-1</sup> es característica de la elongación de enlaces C=C en la lignina [36, 37]. La señal en 1240 cm<sup>-1</sup> se asocia a la flexión de enlaces C-OH tanto en lignina como hemicelulosa [37]. La reducción y desaparición de estas señales se debe entonces a la eliminación de estos componentes de la biomasa. El incremento en la señal de 3340 cm<sup>-1</sup> con el pretratamiento ácido se asocia a un aumento en la proporción de celulosa [36], mientras que su reducción con el pretratamiento alcalino indica una reducción en la intensidad de enlaces de hidrógeno, producto de la conversión de celulosa tipo I a celulosa tipo II (mercerización), típico en los tratamientos alcalinos [38, 39], lo que es consistente con el crecimiento en la señal en 1420 cm<sup>-1</sup> con el pretratamiento alcalino [37].

El LOI es un indicador cualitativo de cambios en la cristalinidad. La entre 1420 y 1430 cm<sup>-1</sup> se relaciona con la vibración simétrica de CH<sub>2</sub>, conocida como banda de cristalinidad y la banda entre 893 y 898 cm<sup>-1</sup> se asigna a la elongación de enlaces C-O-C y se conoce como banda amorfa [40]. Se encontró que los dos pretratamientos incrementaron el grado de cristalinidad, como se muestra en la tabla 3, lo que es consistente con varios estudios previos [31], [36, 37, 41, 42]. El pretratamiento ácido incrementa la cristalinidad removiendo hemicelulosa y celulosa no cristalinas [31, 41]. En el caso de pretratamiento alcalino, además de la remoción de hemicelulosa y lignina, la recristalización de celulosa semicristalina genera un mayor incremento en la cristalinidad [42].

Los datos recogidos por FTIR indican claramente que los pretratamientos fueron capaces de remover parcialmente la lignina y hemicelulosa de la biomasa, llevando a un incremento en el grado de cristalinidad.

Tabla 3: Índice de cristalinidad (LOI) de las muestras pretratadas y sin tratar.

Pretratamiento	LOI (1423/896)
Ninguno	0.93
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.26
NaOH	1.53

### 3.3. Cinética y condiciones de hidrólisis enzimática

Los dos pretratamientos aplicados lograron incrementar la producción de azúcares reductores, con las dos enzimas estudiadas (figura 1). Los hidrolizados de muestras sin pretratar y pretratadas alcanzaron una concentración de azúcares superior al 90% del valor final tras 36 h. y 60 h, respectivamente; lo que contrasta con lo encontrado en otros estudios, en donde este valor se alcanza tras solo 12 h. [43, 44] o 24 h [11]. Lo que indica la posibilidad de que podrían seguirse produciendo azúcares en niveles significativos más allá de las 72 h. Si bien el pretratamiento ácido logró incrementar la producción de azúcares, el efecto es mínimo (130 y 150% para Celluclast 1.5 L y Cellic CTec3, respectivamente) en comparación con lo que se ha encontrado en otros estudios realizados sobre biomasa de Cannabis. Se encontró que un pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% a 160 °C durante 30 min logró un grado de hidrólisis de celulosa del 98,7% [31]. En las mismas condiciones, pero incrementando la temperatura a 170 °C se encuentran grados de hidrólisis de 28,04 y 30,02 g/L. para dos variedades de cannabis [36]. La deficiencia en la producción de azúcares encontrada en este estudio puede explicarse parcialmente por la intensidad del pretratamiento. Generalmente, al usar 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se trabajan cortos tiempos (10 min) [11, 12] y al trabajar por largos tiempos, se maneja menor concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%) [31, 36].

En este trabajo, largos tiempos de trabajo con mayor concentración de ácido podría liberar gran parte de la xilosa, dejando hemicelulosas más resistentes y menos accesibles [12]. También, a pesar de los extensivos lavados, monosacáridos y oligosacáridos resultantes del pretratamiento pueden

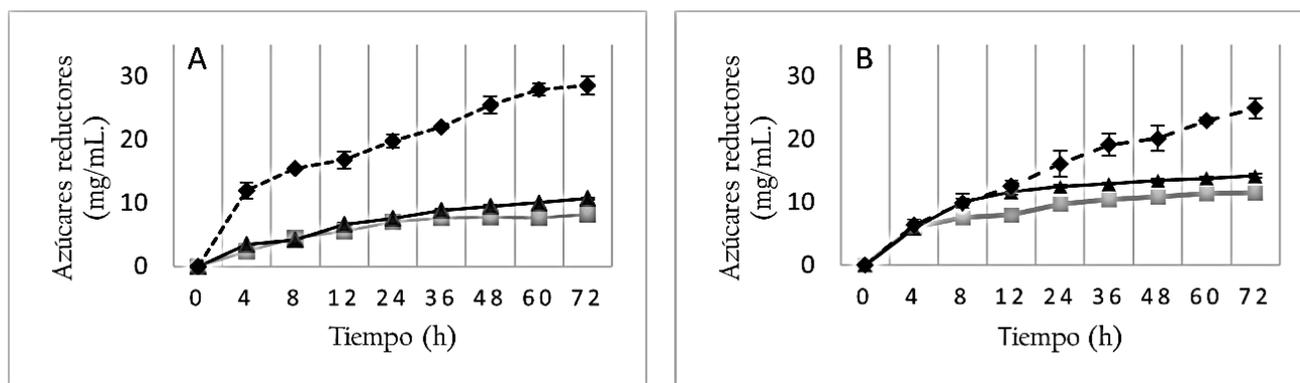


Figura 1: Cinética de hidrólisis enzimática. A. Celluclast 1.5 L, B. Cellic CTec3. Los cuadrados representan la muestra sin pretratar, los triángulos la muestra con pretratamiento ácido y los rombos la muestra con pretratamiento alcalino. Las barras de error representan la desviación estándar.

inhibir la acción enzimática [45]. Sin embargo, el efecto posiblemente más importante es la absorción no productiva de lignina recondensada y celulosa [36]. Todo esto, sumado al incremento en el grado de cristalinidad, contribuyen a que el efecto del pretratamiento ácido en la producción de azúcares sea bajo.

El pretratamiento alcalino fue capaz de incrementar en un grado mucho mayor la producción de azúcares reductores (350 y 220% para Celluclast 1.5 L y Cellic CTec3, respectivamente). Este efecto ha sido ya reportado por algunos autores en biomasa de cannabis. Por ejemplo, con un pretratamiento de a 135 °C por 1 h con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH 2%, se consiguieron concentraciones finales de azúcares (glucosa + xilosa) de 16.0 y 30.0 g/L, respectivamente, tras hidrólisis enzimática [16]. Otro estudio determinó concentraciones finales de glucosa entre 25,5 y 27,2 g/L. tras pretratamiento con NaOH a 121 °C, una eficiencia de conversión mayor a la alcanzada con pretratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1-2% (23.5-26.6 g/L.) [11]. Por el contrario, en otro trabajo se encontró que el pretratamiento ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 160 °C, 30 min) conlleva un mayor grado de hidrólisis de glucosa que un pretratamiento alcalino (NaOH 1%, 140 °C, 1 h); aunque por un margen pequeño, 98.7% vs 96.3% [31]. En comparación con las muestras sin pretratar, el tratamiento alcalino siempre conlleva un incremento del grado de hidrólisis, como lo han definido distintos estudios; por ejemplo, aumento del 60% en el grado de hidrólisis tras pretratamiento con NaOH al 1% a 121 °C [46] y un incremento desde 6.1% hasta 43.7% en el grado de hidrólisis tras pretratamiento con NaOH al 2% a 135 °C [16]. El incremento en el grado de hidrólisis enzimática resultado del tratamiento alcalino se explica por su capacidad de remover gran cantidad de lignina [11], evitando así las uniones no productivas con las enzimas [34].

Dado la mayor efectividad del pretratamiento alcalino, este se escogió para continuar con los siguientes ensayos. Como se puede observar en la tabla 4, el uso de mezclas enzimáticas no tuvo un efecto significativo en la producción de azúca-

res, con respecto a cuando se utiliza solamente Celluclast 1.5 L. Se esperaba que las enzimas accesorio presentes en el coctel enzimático Cellic CTec3 incrementaran la producción al mezclarla con el coctel Celluclast. Sin embargo, este no fue el caso. En otros trabajos, ha sido frecuente utilizar enzimas accesorio como β-glucosidasas [11, 12, 29, 43, 46] o hemicelulasas [20, 31, 33, 36]. Las β-glucosidasas hidrolizan la celobiosa a dos moléculas de glucosa, evitando la acumulación de celobiosa y por lo tanto, su potente efecto inhibitor en la actividad de celulasas [47, 48], mientras que la actividad de las hemicelulasas resulta en mejor acceso enzimático a las microfibras de celulosa [49, 50]. Teniendo en cuenta esto, una opción para incrementar la producción de azúcares podría ser el desarrollar una mezcla enzimática óptima para este tipo de biomasa, como ya se ha hecho para la paja de trigo [51], madera [52] y bagazo de caña de azúcar [53].

Tabla 4: Producción de azúcares reductores con diferentes condiciones experimentales, todas las muestras se sometieron a pretratamiento alcalino. Los experimentos que no comparten una letra tienen una diferencia estadística significativa (α=0.05).

Experimento	Azúcares reductores (mg/mL)
20 UPF/g Celluclast 1.5 L	28.59 ± 1.47 <sup>a</sup>
20 UPF/g Cellic CTec3	24.94 ± 1.59 <sup>b</sup>
10 UPF/g Celluclast 1.5 L + 10 UPF/g Cellic CTec3	28.17 ± 0.74 <sup>a</sup>
Secuencia 1:	
10 UPF/g Celluclast 1.5 L, luego 10 UPF/g Cellic CTec3	26.36 ± 0.41 <sup>ab</sup>
Secuencia 2:	
10 UPF/g Cellic CTec3, luego 10 UPF/g Celluclast 1.5 L	27.67 ± 0.16 <sup>a</sup>

Con los experimentos en secuencia, se buscó incrementar la producción de azúcares evitando la inhibición por retroalimentación de las enzimas. Lo que ya ha sido investigado en tallos de cáñamo, logrando incrementar la producción

de azúcares de 40 g/L. a 46 g/L [16]. En este estudio, no hubo diferencia significativa al aplicar hidrólisis en dos pasos, posiblemente debido a tiempos más cortos de reacción y menor concentración de enzima utilizada en cada paso. Dado el alto costo que representan las enzimas en las biorrefinerías lignocelulósicas, se buscó evaluar el efecto de la carga enzimática en la producción de azúcares. Se encontró que aumentar la carga desde 10 hasta 20 UPF/g genera un claro aumento en la concentración final de azúcares pero por encima de este valor, no se genera un efecto significativo. Esto coincide con lo encontrado por otros autores [13], quienes determinaron que la carga enzimática óptima es de 20 UPF/g, con una carga de sólidos del 10%. La ineffectividad de incrementar la carga enzimática sobre este punto puede deberse a baja digestibilidad de la biomasa, es decir, solo una cantidad limitada de celulosa es accesible a la enzima en determinado momento, debido a lignina o hemicelulosa remanente y/o [54] el aumento en la cristalinidad tras el pretratamiento alcalino.

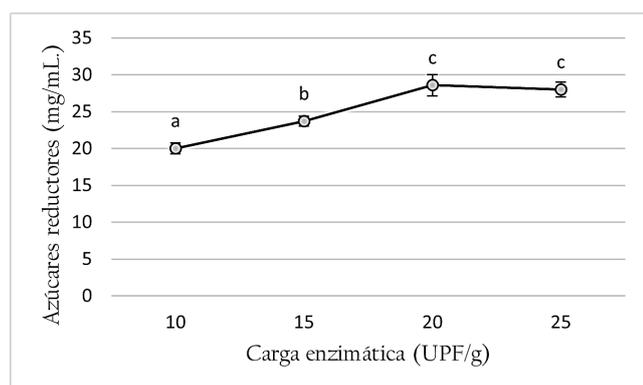


Figura 2: Efecto de la variación de la carga enzimática en la producción de azúcares reductores, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ).

#### 4. Conclusiones

El pretratamiento alcalino de tallos residuales de Cannabis es un método eficiente para eliminar componentes estructurales no celulósicos de la biomasa, llevando consigo un incremento en el grado de cristalinidad de la celulosa. Este pretratamiento logró incrementar la producción hasta 350% con respecto a la biomasa sin pretratar; usando la enzima Celluclast 1.5 L a 20 UPF/g, valor sobre el cual no hay cambio significativo en los azúcares obtenidos. Es así que se puede establecer que esta es una fuente importante de biomasa para la obtención de azúcares, los cuales pueden convertirse subsecuentemente en una variedad de productos con valor agregado.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Proyecto Jóvenes Investigadores e Innovadores en el Departamento del Cauca, a la Universidad del Cauca y demás entidades aliadas, al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Sistema General de Regalías por la financiación de este trabajo.

#### Referencias

- [1] M. Ramírez, “La Industria del Cannabis Medicinal en Colombia”, Fedesarrollo, pp. 1–61, 2019, [En línea]. Disponible en: <https://www.fedesarrollo.org.co/>.
- [2] M. T. Ale, A. C. S. Hastrup, N. M. L. Hansen, y J. Hinge, “Upcycling of Medical Cannabis production and processing residues”. 2020.
- [3] Michigan Department of Environmental Quality, “White paper: The Environmental Impacts of the Marijuana Industry”. 2018, [En línea]. Disponible en: <https://www.michigan.gov/-/media/Project>.
- [4] National Cannabis Industry Association, “Environmental Sustainability in the Cannabis Industry: Impacts, Best Management Practices, and Policy Considerations”. 2020, [En línea]. Disponible en: <https://thecannabisindustry.org/wp-content/uploads/2020/11/NCIA-Environmental-Policy-BMP-October-17-final.pdf>.
- [5] M. Rehman et al., “Evaluation of hemp (Cannabis sativa L.) as an industrial crop: a review”, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 28, núm. 38, pp. 52832–52843, 2021, doi: 10.1007/s11356-021-16264-5.
- [6] G. Crini, E. Lichtfouse, N. Morin-crini, y G. Chanut, “Traditional and New Applications of Hemp”, *Sustain. Agric. Rev.*, vol. 42, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-41384-2.
- [7] F. Dhondt y S. S. Muthu, “Sustainable Hemp Products”, pp. 95–107, 2021.
- [8] L. Marrot et al., “Valorization of Hemp Stalk Waste Through Thermochemical Conversion for Energy and Electrical Applications”, *Waste and Biomass Valorization*, núm. November, 2021, doi: 10.1007/s12649-021-01640-6.
- [9] J. Zhao, Y. Xu, W. Wang, J. Griffin, K. Roozeboom, y D. Wang, “Bioconversion of industrial hemp biomass for bioethanol production: A review”, *Fuel*, vol. 281, núm. June, 2020.
- [10] C. Asquer, E. Melis, E. A. Scano, y G. Carboni, “Opportunities for Green Energy through emerging crops: Biogas valorization of cannabis sativa l. residues”, *Climate*, vol. 7, núm. 12, 2019.

- [11] I. B. Gunnarsson, M. Kuglarz, D. Karakashev, y I. Angelidaki, “Thermochemical pretreatments for enhancing succinic acid production from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.)”, *Bioresour. Technol.*, vol. 182, pp. 58–66, 2015. .
- [12] M. Kuglarz, M. Alvarado-Morales, D. Karakashev, y I. Angelidaki, “Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from industrial hemp in a biorefinery concept”, *Bioresour. Technol.*, vol. 200, pp. 639–647, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.081.
- [13] S. Gandolfi, L. Pistone, G. Ottolina, P. Xu, y S. Riva, “Hemp hurds biorefining: A path to green l-(+)-lactic acid production”, *Bioresour. Technol.*, vol. 191, pp. 59–65, 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.04.118.
- [14] P. Brazdauskas et al., “Effect of aluminium sulphate-catalysed hydrolysis process on furfural yield and cellulose degradation of *Cannabis sativa* L. shives”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 89, pp. 98–104, 2016, doi: 10.1016/j.biombioe.2016.01.016.
- [15] J. Rizhikovs et al., “Pretreated hemp shives: Possibilities of conversion into levoglucosan and levoglucosenone”, *Ind. Crops Prod.*, vol. 139, núm. June, p. 111520, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111520.
- [16] M. M. Khattab y Y. Dahman, “Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate bioplastics using agro-industrial residues of hemp hurd biomass”, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 42, núm. 7, pp. 1115–1127, 2019, doi: 10.1007/s00449-019-02109-6.
- [17] A. Ji, L. Jia, D. Kumar, y C. G. Yoo, “Recent advancements in biological conversion of industrial hemp for biofuel and value-added products”, *Fermentation*, vol. 7, núm. 1, 2021, doi: 10.3390/fermentation7010006.
- [18] C. Moscariello, S. Matassa, G. Esposito, y S. Papiro, “From residue to resource: The multifaceted environmental and bioeconomy potential of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.)”, *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 175, núm. August, p. 105864, 2021, doi: 10.1016/j.resconrec.2021.105864.
- [19] F. P. Gomez, J. Hu, y M. A. Clarke, “Cannabis as a Feedstock for the Production of Chemicals, Fuels, and Materials: A Review of Relevant Studies to Date”, *Energy and Fuels*, vol. 35, núm. 7, pp. 5538–5557, 2021, doi: 10.1021/acs.energyfuels.0c04121.
- [20] L. Das et al., “Comparative Evaluation of Industrial Hemp Cultivars: Agronomical Practices, Feedstock Characterization, and Potential for Biofuels and Bioproducts”, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, pp. 6200–6210, 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b06145.
- [21] B. Adney y J. Baker, “Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP)”, núm. January. 2008.
- [22] A. Sluiter et al., “Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples”, *Lab. Anal. Proced.*, pp. 1–9, 2008.
- [23] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, y D. Templeton, “Determination of Ash in Biomass”, *Lab. Anal. Proced.*, pp. 1–5, 2005.
- [24] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, y D. Templeton, “Determination of Extractives in Biomass”, *Lab. Anal. Proced.*, pp. 1–9, 2008.
- [25] S. Vaz Jr, Ed., *Analytical Techniques and Methods for Biomass*, 1a ed. Springer Cham, 2016.
- [26] A. Hernández-López, D. A. Sanchez Felix, Z. Z. Sierra, I. G. Bravo, T. D. Dinkova, y A. X. Avila-Alejandre, “Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict”, *ACS Omega*, vol. 5, núm. 50, pp. 32403–32410, 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c04467.
- [27] Z. Barta, E. Kreuger, y L. Björnsson, “Effects of steam pretreatment and co-production with ethanol on the energy efficiency and process economics of combined biogas, heat and electricity production from industrial hemp”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, núm. 56, 2013.
- [28] B. G. Keiller, M. Potter, R. A. Burton, y P. J. van Eyk, “Elucidating the degradation reaction pathways for the hydrothermal carbonisation of hemp via biochemical compositional analysis”, *Fuel*, vol. 294, núm. March, 2021, doi: 10.1016/j.fuel.2021.120450.
- [29] E. Kreuger, B. Sipos, G. Zacchi, S. E. Svensson, y L. Björnsson, “Bioconversion of industrial hemp to ethanol and methane: The benefits of steam pretreatment and co-production”, *Bioresour. Technol.*, vol. 102, núm. 3, pp. 3457–3465, 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.126.
- [30] M. U. Gulmen, “Development of a recombinant brewing yeast to produce beer from hemp extract (*Cannabis Sativa* L.)”, Western University, 2021.
- [31] L. Das et al., “Industrial hemp as a potential bioenergy crop in comparison with kenaf, switchgrass and biomass sorghum”, *Bioresour. Technol.*, vol. 244, núm. August, pp. 641–649, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.008.
- [32] B. Sipos, E. Kreuger, S. E. Svensson, K. Réczey, L. Björnsson, y G. Zacchi, “Steam pretreatment of dry and ensiled industrial hemp for ethanol production”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, núm. 12, pp. 1721–1731, 2010, doi: 10.1016/j.biombioe.2010.07.003.
- [33] M. B. Viswanathan et al., “Variability in structural carbohydrates, lipid composition, and cellulosic sugar production from industrial hemp varieties”, *Ind. Crops Prod.*, vol. 157, núm. August, p. 112906, 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112906.

- [34] C. Geun, X. Meng, Y. Pu, y A. J. Ragauskas, “The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review”, *Bioresour. Technol.*, vol. 301, núm. January, p. 122784, 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.122784.
- [35] K. Kucharska, P. Rybarczyk, I. Hołowacz, R. Łukajtis, M. Glinka, y M. Kamiński, “Pretreatment of lignocellulosic materials as substrates for fermentation processes”, *Molecules*, vol. 23, núm. 11, pp. 1–32, 2018, doi: 10.3390/molecules23112937.
- [36] J. Zhao, Y. Xu, W. Wang, J. Griffin, y D. Wang, “Conversion of liquid hot water, acid and alkali pretreated industrial hemp biomasses to bioethanol”, *Bioresour. Technol.*, vol. 309, p. 123383, 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2020.123383.
- [37] R. E. Abraham, J. Vongsivut, C. J. Barrow, y M. Puri, “Understanding physicochemical changes in pretreated and enzyme hydrolysed hemp (*Cannabis sativa*) biomass for biorefinery development”, *Biomass Convers. Biorefinery*, vol. 6, núm. 2, pp. 127–138, 2016.
- [38] A. Kljun, T. A. S. Benians, F. Goubet, F. Meulewaeter, J. P. Knox, y R. S. Blackburn, “Comparative analysis of crystallinity changes in cellulose polymers using ATR-FTIR, X-ray diffraction, and carbohydrate-binding module probes”, *Biomacromolecules*, vol. 12, núm. 11, pp. 4121–4126, 2011, doi: 10.1021/bm201176m.
- [39] O. A. Salinas, R. Benítez Benítez, y J. Martin Franco, “Chemical Modification of Fique Fiber by Alkalization and Esterification Utilizing Fique Fiber Dust as Residue of the Fiquera Industry”, *J. Nat. Fibers*, vol. 00, núm. 00, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1080/15440478.2020.1841061.
- [40] K. Karimi y M. J. Taherzadeh, “A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity”, *Bioresour. Technol.*, vol. 200, pp. 1008–1018, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.11.022.
- [41] I. Semhaoui et al., “Eco-friendly process combining acid-catalyst and thermomechanical pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of hemp hurds”, *Bioresour. Technol.*, vol. 257, núm. February, pp. 192–200, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.107.
- [42] N. Stevulova et al., “Properties Characterization of Chemically Modified Hemp Hurds”, *Materials (Basel)*, vol. 7, núm. pp. 8131–8150, 2014.
- [43] G. Moxley, Z. Zhu, y Y. H. P. Zhang, “Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, núm. 17, pp. 7885–7890, 2008, doi: 10.1021/jf801303f.
- [44] M. Kuglarz, I. B. Gunnarsson, S. E. Svensson, T. Prade, E. Johansson, y I. Angelidaki, “Ethanol production from industrial hemp: Effect of combined dilute acid/steam pretreatment and economic aspects”, *Bioresour. Technol.*, vol. 163, pp. 236–243, 2014, doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.049.
- [45] L. J. Jönsson y C. Martín, “Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects”, *Bioresour. Technol.*, vol. 199, pp. 103–112, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.009.
- [46] A. Pakarinen, J. Zhang, T. Brock, P. Maijala, y L. Viikari, “Enzymatic accessibility of fiber hemp is enhanced by enzymatic or chemical removal of pectin”, *Bioresour. Technol.*, vol. 107, pp. 275–281, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.101.
- [47] H. Teugjas y P. Väljamäe, “Selecting  $\beta$ -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 6, núm. 1, p. 105, 2013, doi: 10.1186/1754-6834-6-105.
- [48] R. R. Singhanía, A. K. Patel, R. K. Sukumaran, C. Larroche, y A. Pandey, “Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production”, *Bioresour. Technol.*, vol. 127, pp. 500–507, ene. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.012.
- [49] R. Agrawal et al., “Improved saccharification of pilot-scale acid pretreated wheat straw by exploiting the synergistic behavior of lignocellulose degrading enzymes”, *RSC Adv.*, vol. 5, núm. 87, pp. 71462–71471, 2015, doi: 10.1039/C5RA13360B.
- [50] F. F. Sun et al., “Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass”, *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 79–80, pp. 42–48, nov. 2015, doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.020.
- [51] R. Agrawal et al., “Synergistic Enzyme Cocktail to Enhance Hydrolysis of Steam Exploded Wheat Straw at Pilot Scale”, *Front. Energy Res.*, vol. 6, nov. 2018.
- [52] S. Malgas, R. Chandra, J. S. Van Dyk, J. N. Saddler, y B. I. Pletschke, “Formulation of an optimized synergistic enzyme cocktail, HoloMix, for effective degradation of various pre-treated hardwoods”, *Bioresour. Technol.*, vol. 245, pp. 52–65, dic. 2017.
- [53] J. Méndez Arias, L. F. A. Modesto, I. Polikarpov, y N. Pereira, “Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: Optimization and synergism studies”, *Biotechnol. Prog.*, vol. 32, núm. 5, pp. 1222–1229, sep. 2016, doi: 10.1002/btpr.2306.
- [54] X. Luo et al., “Promoting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by inexpensive soy protein”, *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, núm. 1, p. 51, dic. 2019, doi: 10.1186/s13068-019-1387-x.