

**EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE CBE, MEDIANTE
INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE UNA MEZCLA GRASA A NIVEL
LABORATORIO EN SIGRA S.A**

**YINA PAOLA DIAZ CORREDOR
IDANIA LIZETH QUINTERO HERREÑO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2018**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE CBE, MEDIANTE
INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE UNA MEZCLA GRASA A NIVEL
LABORATORIO EN SIGRA S.A**

**YINA PAOLA DIAZ CORREDOR
IDANIA LIZETH QUINTERO HERREÑO**

**proyecto integral de grado para optar al título
INGENIERO QUÍMICO**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D.C
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado Edgar Fernando Moreno

Jurado 1. Javier Francisco Rey

Jurado 2. Nubia Liliana Becerra

Bogotá D.C. Febrero de 2018.

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García – Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García – Peña

Decano General de la Facultad de Ingeniería

Ing. Julio Cesar Fuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores

AGRADECIENTOS

Primero agradecemos a Dios por permitirnos culminar este proyecto, a nuestras familias por sus consejos, apoyo incondicional y comprensión durante esta etapa de nuestras vidas que hoy culmina, a nuestros amigos por acompañarnos en el proceso de aprendizaje en la universidad; A la empresa SIGRA S.A por permitirnos desarrollar este proyecto de investigación, así como el aprendizaje otorgado en los laboratorios de la empresa, Al ingeniero Andrés Ceballos por apoyarnos, aconsejarnos y guiarnos durante el desarrollo del proyecto, a las personas del laboratorio de calidad por compartir con nosotras sus conocimientos y ayuda en todo momento, Al ingeniero Javier Rey por su calidad humana y por su colaboración en el desarrollo inicial del proyecto y por ultimo al ingeniero Fernando Moreno por su profesionalismo y acompañamiento en el desarrollo de este proyecto con el fin de obtener nuestro título de ingeniero Químico.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
OBJETIVOS	22
1. GENERALIDADES	23
1.1 MANTECA DE CACAO	23
1.1.1 Polimorfismo y fase de la manteca de cacao	24
1.1.2 Cristalización de la manteca de cacao	25
1.1.3 Contenido de sólidos grasos en la manteca de cacao	26
1.1.4 Fusión de la manteca de cacao	27
1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MANTECA DE CACAO	28
1.3 ALTERNATIVAS DE LA MANTECA DE CACAO	29
1.3.1 Equivalente de la manteca de cacao.	30
1.4 REACCIÓN DE INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA	32
2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESODE PRODUCCIÓN DEL CBE	33
2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	34
2.1.1 Artículos informativos para la obtención del Equivalente de manteca de cacao	34
2.1.1.1 Lipase-Catalyzed Acidolysis of palm Mid fraction Oil with palmitic and stearic fatty Acid Mixture for production of Cocoa Butter Equivalent	34
2.1.1.2 Lipase-Catalyzed synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and saturated fatty acid Distillate from palm Oil Physical Refinery,	35
2.1.1.3 Enzymatic Transesterification of Palm Olein for the Production of Special Fats in a Batch Type Reactor	36
2.1.1.4 Fractionation produces for obtaining cocoa butter- like fat from enzymatically interesterified Palm Olein	37
2.1.1.5 Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction	38
2.1.1.6 Enzymatic Production of Cocoa Butter Equivalents High in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearin in Continuous Packed Bed Reactors	39
2.1.1.7 Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents	40
2.1.2 Patentes informativas para la obtención del Equivalente de manteca de cacao, (CBE)	41
2.1.2.1 Method for enzymatic transesterfication preparation of cocoa butter equivalent by using 33-DEG C palm oil.	41
2.1.2.2 Preparation method of Cocoa Butter Equivalent	42
2.1.2.3 Method for continuously preparing cocoa butter equivalent.	43
2.1.2.4 Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterfication	44

2.1.2.5 Method for preparing cocoa butter equivalent by aid of 28-degree palm oil médium fractionation substances (POMF).	45
2.1.3 Tesis informativas para la obtención del equivalente de manteca de cacao, (CBE)	47
2.1.3.1 Evaluación de le enzima lipozyme tl im en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales	47
2.1.3.2 Evaluación de la obtención del equivalente de manteca de cacao (cocoa butter equivalent) mediante la reacción enzimática entre oleína de palma y ácido esteárico	47
2.1.3.3 Obtención de lípidos estructurados a escala semi-industrial mediante transesterificación con lipasa estereoespecíficas inmovilizadas	48
2.2 ENSAYOS PRELIMINARES	50
2.2.1 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS	50
2.2.1.1 Oleína de palma	50
2.2.1.2 Oleína de palma totalmente hidrogenada	51
2.2.1.3 Ácido esteárico	52
2.2.1.4 Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei	52
2.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	53
2.2.3 Montaje del reactor para realizar la reacción de interesterificación	56
2.2.4 Descripción de procedimiento Ensayos preliminares.	59
2.2.4.1 Primer ensayo Preliminar	60
2.2.4.1.1 Análisis de resultados del ensayo preliminar 1	62
2.2.4.2 Segundo ensayo Preliminar	64
2.2.4.2.1 Análisis de resultados del segundo ensayo preliminar	65
2.2.4.3 Tercer ensayo Preliminar.	66
2.2.4.3.1 Análisis de resultados del tercer ensayo preliminar.	68
2.2.5 Fraccionamientos de referencia.	69
2.2.5.1 Descripción fraccionamiento del primer ensayo preliminar	70
2.2.5.1.1 Resultados del fraccionamiento del primer ensayo preliminar.	70
2.2.5.2. Descripción del fraccionamiento para el segundo ensayo preliminar	71
2.2.5.2.1 Resultados de los fraccionamientos del segundo ensayo preliminar	72
2.2.5.3 Descripción del fraccionamiento para el tercer ensayo preliminar	73
2.2.5.3.1 Resultado del fraccionamiento del tercer ensayo preliminar	74
3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE CBE.	76
3.1 MATERIAS PRIMAS	76
3.1.1 Oleína de palma	76
3.1.2 Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei”.	76
3.1.3 Ácido esteárico. (Pureza media).	76
3.1.4 Ácido esteárico. (Pureza alta).	77
3.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	77
3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	77
3.3.1 Realización del diseño de experimentos para el ácido esteárico de pureza media	78

3.3.2 Realización del diseño de experimentos para el ácido esteárico de pureza alta.	79
3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS (Ácido esteárico "Pureza Media")	80
3.4.1.1 análisis de resultados Experimento 1 (T:63°C; R:1:2,25). (replica central)	81
3.4.1.2 análisis de resultados experimento 2 (T:60°C; R: 1:1,5).	83
3.4.1.3 Análisis de resultados experimento 3 (T:60°C; R: 1:2,25)	84
3.4.1.4 Análisis de resultados experimento 4 (T: 60°C; R: 1:3).	85
3.4.1.5 Análisis de resultados experimento 5 (T:63°C; R: 1:2,25).	87
3.4.1.6 Análisis de resultados experimento 6 (T:63°C; R: 1:1,5).	88
3.4.1.7 Análisis de resultados experimento 7 (T:63°C; R: 1:3).	90
3.4.1.8 Análisis de resultados experimento 8 (T:66°C; R: 1:1,5).	91
3.4.2 Análisis de varianza del triglicérido POP en el diseño de experimentos con ácido esteárico de "pureza media".	93
3.4.2.1 Análisis de la gráfica de superficie de POP	94
3.4.2.2 Análisis de varianza para el triglicérido POS.	95
3.4.2.3 Análisis de varianza para el triglicérido SOS	97
3.4.3 Análisis de predicción y óptima respuesta para el diseño experimental con ácido esteárico de "Pureza Media".	100
3.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS (Ácido esteárico "Pureza Alta")	102
3.5.1 Análisis de varianza para el triglicérido POP.	103
3.5.2 Análisis de varianza para el Triglicérido POS	106
3.5.3 Análisis de varianza del Triglicérido SOS	108
4. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MEZCLA GRASA DE REACCIÓN Y LA MANTECA DE CACAO	115
4.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS REALIZADOS A NIVEL LABORATORIO	115
4.1.1 Determinación del índice de yodo.	115
4.1.2 Determinación del índice de acidez	116
4.1.3 Determinación del contenido de sólidos (curva de sólidos).	117
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MANTECA DE CACAO	118
4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MEZCLA GRASA OBTENIDA DURANTE EL TIEMPO DE REACCIÓN	119
4.3.1 Índice de acidez	119
4.3.2 Índice de yodo.	121
4.3.3 Contenido de grasa sólida	122
5. COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL CBE	124
5.1 VALOR DE LA INVERSIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO	124
5.1.1 Costos de producción de los ensayos preliminares	125
5.1.2 Costos de producción para la primera parte del diseño experimental	125

5.1.3 Costos de producción de la segunda parte del diseño experimental.	125
5.1.4 Costos de producción de los análisis de resultados efectuados en el proyecto	126
6. CONCLUSIONES	128
7. RECOMENDACIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	130
ANEXOS	134

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición de triglicéridos de manteca de cacao de diferentes orígenes	23
Tabla 2. Clasificación de las Alternativas a la Manteca de Cacao (CBA)	30
Tabla 3. Certificado de referencia de los mayores TAG (%) del material utilizado (fracción media de palma) (g/100g)	34
Tabla 4. Composición (%) en triglicéridos del producto interesterificado sin fraccionar y el de sus fracciones.	37
Tabla 5. Composición de diversas fracciones (F1, F2, F3) de oleína de palma interesterificada obtenida mediante diferentes procedimientos de fraccionamiento con disolventes. (A B C)	38
Tabla 6. composición de triacylglicerol (área%) de los productos grasos (CBE) a varias relaciones en peso de sustratos (PMF / FHSO)	41
Tabla 7. Composición de triglicéridos de la manteca de cacao y de la investigación realizada.	42
Tabla 8. Resumen de las variables del proceso para la obtención de CBE encontradas en la revisión bibliográfica realizada.	49
Tabla 9. Descripción de las variables utilizadas en la elaboración de ensayos preliminares para obtención de CBE's.	59
Tabla 10. Condiciones de operación del primer ensayo preliminar	61
Tabla 11. Muestras obtenidas en el primer ensayo preliminar.	62
Tabla 12. Condiciones de operación del segundo ensayo preliminar	64
Tabla 13. Muestras obtenidas en el segundo ensayo preliminar.	65
Tabla 14. Condiciones de operación del tercer ensayo preliminar.	67
Tabla 15. Muestras obtenidas en el tercer ensayo preliminar.	67
Tabla 16. Distribución de los niveles de los factores del diseño de experimentos.	78
Tabla 17. Distribución de los factores dependientes del diseño de experimentos, con ácido esteárico de pureza media.	79
Tabla 18. Distribución de las variables independientes del diseño de experimentos, con ácido esteárico de alta pureza.	80
Tabla 19. Porcentaje de los TAG's de interés en la cuarta hora de reacción para los experimentos realizados con ácido esteárico "Pureza Media".	93
Tabla 20. análisis de varianza TAG POP. Diseño con ácido esteárico de "pureza media".	93
Tabla 21. análisis de varianza TAG POS. Diseño con ácido esteárico de "pureza media".	95
Tabla 22. Análisis de varianza TAG SOS. Diseño con ácido esteárico "Pureza Media".	98
Tabla 23. Datos de predicción para los triglicéridos de interés. Diseño de experimentos con ácido de "Pureza Media".	101

Tabla 24.Optimización de respuesta Para las condiciones de operación (Relación- Temperatura) con respecto a los porcentajes de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) “Pureza Media”.	102
Tabla 25.Porcentaje de los TAG´s de interés en la cuarta hora de reacción para los experimentos realizados con ácido esteárico “Pureza Alta”	103
Tabla 26.Análisis de varianza TAG POP. Diseño con ácido esteárico “Pureza Alta”	104
Tabla 27.Análisis de varianza TAG POS. Diseño con ácido esteárico “Pureza Alta”	106
Tabla 28.Análisis de varianza TAG SOS. Diseño con ácido esteárico “Pureza Alta”.	109
Tabla 29.Datos de predicción para los triglicéridos de interés. Diseño de experimentos con ácido de “Pureza Alta”	111
Tabla 30.Optimización de respuesta Para las condiciones de operación (Relación- Temperatura) con respecto a los porcentajes de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) “Pureza Alta”	112
Tabla 31.valores obtenidos a nivel laboratorio para índice de yodo e índice de acidez de la manteca de cacao.	118
Tabla 32.Contenido de grasa sólida de la manteca de cacao.	119
Tabla 33.Mejores muestras obtenidas con respecto al índice de acidez a nivel laboratorio.	120
Tabla 34.Mejores muestras obtenidas con respecto al índice de yodo a nivel laboratorio.	121
Tabla 35.Precios de materias primas y solventes cotizados en junio del año 2017.	124
Tabla 36.Costos de producción de los ensayos preliminares.	125
Tabla 37.costos de producción: primera parte del diseño experimental.	125
Tabla 38.Costos de producción de producción para la segunda parte del diseño experimental.	126
Tabla 39.Costos de los análisis de laboratorio.	126

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Equipos e Instrumentos	pág 53
----------------------------------	-----------

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Estructura cristalina de la manteca de cacao.	25
Imagen 2. Temperatura de cristalización de la manteca de cacao.	26
Imagen 3. Proyección de cadenas para polimorfos α , β' y β .	27
Imagen 4. Relación entre la pureza y la variación de temperatura con el país de origen.	28
Imagen 5. . Esquema del CBE mediante interesterificación enzimática.	31
Imagen 6. Reacción de interesterificación enzimática.	32
Imagen 7. DSC Termograma para la estructura de la manteca durante el ciclo de calentamiento y enfriamiento. (PO: PFAM 1:3)	35
Imagen 8. Transcurso del tiempo de la interesterificación en el experimento 7 del diseño experimental I, Mostrando cambios en la composición de los triglicéridos. POP, POS, SOS.	39
Imagen 9. Esquema de una etapa de la primera velocidad de mezcla de la presente invención.	43
Imagen 10. CBE preparado de acuerdo con la presente patente, se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento	44
Imagen 11. DSC de la manteca de cacao natural.	45
Imagen 12. DSC de la cristalinidad de la manteca de cacao preparada por el procedimiento de la presente invención.	45
Imagen 13. Contenido de sólidos del equivalente de manteca de cacao (CBE), manteca de cacao (CB) y 28 gramos de extracto de aceite de palma intermedio (POMF)	46
Imagen 14. Oleína de palma	51
Imagen 15. Oleína de palma totalmente hidrogenada	51
Imagen 16. Ácido esteárico "Pureza Baja"	52
Imagen 17. Enzima Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei.	53
Imagen 18. Montaje para realizar la reacción de interesterificación	57
Imagen 19. Ácido esteárico "pureza media"	77
Imagen 20. Ácido esteárico "AppliChem Panreac"	77

LISTA DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Triglicéridos de interés Vs Tiempo de reacción. Primer ensayo preliminar	62
Gráfica 2. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs Tiempo de reacción. Primer ensayo preliminar	63
Gráfica 3. Comportamiento de los TAG's de interés con respecto al tiempo de reacción. Segundo ensayo preliminar	65
Gráfica 4. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs tiempo de reacción. Segundo ensayo preliminar	66
Gráfica 5. Comportamiento de los TAG's de interés con respecto al tiempo de reacción. Tercer ensayo preliminar	68
Gráfica 6. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs tiempo de reacción. Tercer ensayo preliminar	69
Gráfica 7. Comparación de triglicéridos del CB de referencia y el fraccionamiento del experimento preliminar 1	70
Gráfica 8. Comparación de TAG's del CB de referencia y el fraccionamiento 1 del experimento preliminar 2.	72
Gráfica 9. Comparación de TAG's del CB de referencia y el fraccionamiento 2 del experimento preliminar 2.	73
Gráfica 10. Comparación de triglicéridos del CB de referencia y el fraccionamiento del tercer ensayo preliminar.	74
Gráfica 11. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 1	81
Gráfica 12. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 1.	82
Gráfica 13. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 2	83
Gráfica 14. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 2.	83
Gráfica 15. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 3.	84
Gráfica 16. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 3.	85
Gráfica 17. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 4	85
Gráfica 18. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 4	86
Gráfica 19. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 5.	87
Gráfica 20. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 5.	87
Gráfica 21. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 6	88
Gráfica 22. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 6.	89
Gráfica 23. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 7	90
Gráfica 24. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 7	90
Gráfica 25. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción.	

Experimento 8	91
Gráfica 26.Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 8.	92
Gráfica 27.Superficie de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	94
Gráfica 28.Contorno de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	95
Gráfica 29.Superficie de POS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	96
Gráfica 30.Contorno de POS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	97
Gráfica 31.Superficie de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	99
Gráfica 32.Contorno de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”	100
Gráfica 33.Superficie de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”	105
Gráfica 34.Contorno de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”	106
Gráfica 35.Superficie de POS vs relación y temperatura. Acido “Pureza Alta”	107
Gráfica 36.Contorno de POS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”	108
Gráfica 37.Superficie de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”	110
Gráfica 38.Contorno de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”	111
Gráfica 39.Contenido de grasa sólida Primer diseño experimental.	122
Gráfica 40.Contenido de grasa sólida Segundo diseño experimental	122

LISTA DE DIAGRAMAS

	pág.
Diagrama 1.Obtención de la manteca de cacao	24
Diagrama 2.Proceso para la obtención del CBE	33
Diagrama 3.Procedimiento para llevar a cabo la reacción enzimática	58
Diagrama 4.Procedimiento para la limpieza de la enzima.	59
Diagrama 5.Descripción del fraccionamiento ensayo preliminar 1	70
Diagrama 6.Descripción del fraccionamiento 1 realizado en el segundo ensayo preliminar	71
Diagrama 7.Descripción del fraccionamiento 2 realizado en el segundo ensayo preliminar	72
Diagrama 8.Descripción del fraccionamiento realizado en el tercer ensayo preliminar	74
Diagrama 9.Procedimiento para determinar el índice de yodo	116
Diagrama 10.Procedimiento para determinar el índice de acidez.	117
Diagrama 11.Procedimiento para determinar el contenido de grasa sólida.	118

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Triglicérido POP Ácido esteárico "Pureza Media"	94
Ecuación 2. Triglicérido POS Ácido esteárico "Pureza Media"	96
Ecuación 3. Triglicérido SOS Ácido esteárico "Pureza Media"	98
Ecuación 4. Triglicérido POP Ácido esteárico "Pureza Alta"	104
Ecuación 5. Triglicérido POS Ácido esteárico "Pureza Alta"	107
Ecuación 6. Triglicérido SOS Ácido esteárico "Pureza Alta"	109

RESUMEN

En el presente trabajo de grado se desarrolló una investigación experimental con el fin de evaluar el proceso de obtención de un Equivalente a la Manteca de Cacao (CBE) en la empresa SIGRA S.A utilizando principalmente dos materias primas: Ácido esteárico y Oleína de palma las cuales fueron empleadas para desarrollar este proyecto, para ello se realizó una comparación entre la mezcla grasa obtenida y una manteca de cacao de referencia, así como, el análisis del comportamiento de las variables de reacción con respecto a los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS).

Para el logro de los objetivos se empezó con una investigación completa basada en artículos, tesis y patentes encontradas en diferentes páginas científicas como Spacenet, Springer, ELSEVIER y EBSCO enfocadas específicamente en el proceso de obtención de CBE además que involucraran oleína de palma y ácido esteárico. Con la información encontrada se desarrollaron tres ensayos preliminares donde se involucraron variables como (temperatura, relación, agitación, tiempo de reacción y porcentaje de enzima) con el fin de determinar cuáles eran las mejores condiciones a trabajar durante la ejecución de los siguientes experimentos.

Posteriormente se realizaron dos diseños experimentales 3^2 uno con ácido esteárico de "Pureza Media" y otro para "Pureza Alta" con el fin de analizar el efecto de las variables (temperatura y Relación) en cada uno de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS), específicamente los obtenidos en la cuarta hora de reacción, así como la optimización de cada diseño experimental con el fin de obtener composiciones con mayor similitud a las de una manteca de cacao.

Para el primer diseño experimental se determinaron las mejores condiciones de operación para llegar a obtener un CBE las cuales son: Temperatura (65,70-66) °C y Relación (1:2,38-1:2,67), logrando obtener los rangos de composición de los triglicéridos de interés POP (21,47-24,5) %; POS (22,59-32,26) %, SOS (15,14-18,08) %. Con respecto al segundo diseño experimental se determinaron los rangos óptimos de las condiciones de operación los cuales son: Temperatura (60,67- 61,49) °C y Relación (1:0,95-1:1,04). Dando a conocer las composiciones de los TAG de interés POP (8,5 -10,8) %; POS (29,95 - 31,53) %, SOS (28,48 - 33,69) %.

Se realizaron diferentes análisis físico-químicos a las muestras obtenidas en cada experimentación tales como: Índice de yodo el cual mostro que los resultados obtenidos son similares a los de la manteca de cacao, el índice de acidez demostró que es necesario un proceso de separación, el análisis de curva de sólidos mostro la mejor trayectoria de la mezcla grasa obtenida y gracias a las cromatografías de gases se obtuvo el perfil de triglicéridos. De igual forma se reflejaron los costos de las materias primas, así como los costos de los análisis físico-químicos realizados en toda la experimentación para el desarrollo del proyecto a nivel de laboratorio.

Palabras clave: Equivalente a la manteca de cacao, Lipozyme IM Rhizomucor Miehei, Interesterificación enzimática, triglicéridos (POP, POS, SOS), contenido de grasa sólida, Perfil de triglicéridos, índice de yodo, acidez, viabilidad de costo.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años la planta de cacao ha sido utilizada en gran variedad de procesos alimenticios; entre estos procesos está la fabricación cobertura de chocolate, rellenos de confitería, industria de cosméticos, helados, galletas, pretzels, estabilizador en postres e incluso como reemplazo de aceite para cocinar.

Debido a que la manteca de cacao (CB) es costosa en comparación con otras grasas vegetales y aceites comerciales; se han buscado alternativas a la manteca de cacao los cuales están clasificados en tres grupos: sustituto de manteca de cacao (CBS), derivado de grasas láuricas, indicando que no es compatible con la manteca de cacao; Reemplazante de manteca de cacao (CBR), proveniente de grasas no láuricas y es parcialmente compatible con la manteca de cacao, por último, Equivalente de manteca de cacao (CBE), siendo el más compatible con la manteca de cacao, teniendo un perfil de ácidos grasos y propiedades fisicoquímicas más afín con el CB.

La elaboración del Equivalente a la manteca de cacao (CBE) en la Industria de Alimentos, especialmente grasas y aceites ha sido ampliamente estudiada. El primer estudio se realizó en el año 1987, dónde ESPACENET hizo una publicación llamada "Un proceso de tratamiento y evaluación de manteca de cacao", en la investigación se hizo una combinación de ácido esteárico con una mezcla grasa para tener un producto similar a la manteca de cacao. Desde esa fecha se han realizado cantidad de investigaciones hasta el día de hoy con diferentes materias primas y diferentes variables involucradas durante los procesos para la obtención de un CBE.

La empresa SIGRA S.A es una empresa Nacional ubicada en Bogotá, está dedicada al desarrollo, producción y comercialización de productos grasos para la industria panificadora y de alimentos; con el objetivo de ser líderes en el mercado se busca por medio del área de investigación y desarrollo el uso de productos obtenidos en los procesos realizados por la empresa, así como el empleo de nuevas tecnologías y procesos para la evaluación de la productividad elaborada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de un Equivalente a la Manteca de Cacao estudiando el efecto que tienen las variables de Temperatura, Relación y mezcla de materias primas sobre el producto obtenido mediante la investigación; también, encontrar la mejor interacción entre las variables involucradas durante la experimentación para reconocer cuál es el mejor dato a trabajar para conseguir un producto similar a la manteca de cacao.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de obtención del equivalente de manteca de cacao mediante interesterificación enzimática de una mezcla grasa en SIGRA S.A.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las variables del proceso de producción del CBE mediante ensayos preliminares.
- Determinar las condiciones de operación para la obtención del equivalente de manteca de cacao (CBE).
- Evaluar las propiedades físicas y químicas entre el producto obtenido (CBE), y la manteca de cacao.
- Evaluar los costos de producción del CBE.

1. GENERALIDADES

Dado que la finalidad del proyecto consiste en la obtención del equivalente de manteca de cacao, es necesario plantear algunos conceptos que sirvan de apoyo hacia la interpretación del proyecto. En este capítulo se plantean los fundamentos necesarios para el desarrollo del proyecto de investigación, donde se da a conocer la información del producto a obtener, la elaboración de este producto a partir de otras materias primas previamente y la ocupación que tiene cada una de las materias primas en el paso a paso del proceso de obtención de un equivalente a la manteca de cacao.

1.1 MANTECA DE CACAO

La manteca de cacao (CB) es una grasa natural obtenida de las semillas de cacao (*Theobroma cacao*), comúnmente utilizado como ingrediente importante para la producción de chocolate. Su composición consiste principalmente en triacilglicéridos (TAG's): glicerol-1,3-dipalmiato-2-oleato (POP, P palmítico, O, oleico), glicerol-1-pal-mitato-2-oleato-3-estearato, (POST; St stearic) y glicerol-1,3-diestearato-2-oleato (StOSt).¹ "Hay tres áreas principales en el mundo en donde crece el árbol de cacao; África Occidental, Asia y América Central y del Sur, dependiendo del origen de la manteca de cacao, existen diferencias en la composición de triglicéridos"², de acuerdo a la tabla 1; que representa la composición de triglicéridos de diferentes orígenes, el ácido esteárico varía en un 3% mientras que el ácido oleico con un porcentaje mayor a 1%; como se observa, la diferencia no es mayor, aunque es dominante su uso para proyectos de investigación.

Tabla 1. Composición de triglicéridos de manteca de cacao de diferentes orígenes

	<i>Sur América (%)</i>	<i>Norte y Centro América (%)</i>	<i>África %</i>	<i>Asia %</i>
POP	19.0	18.6	18.4	18.6
POST	38.0	38.9	39.1	40.0
StOSt	26.0	26.9	28.2	30.8
AOST	0.5	0.6	0.6	0.8
POO	3.4	2.7	2.2	1.2
StOO	5.7	5.3	4.7	2.9
PLIP	1.1	1.0	1.0	0.8
PLIST	3.5	3.3	3.2	2.9
StLIST	2.8	2.7	2.5	2.2

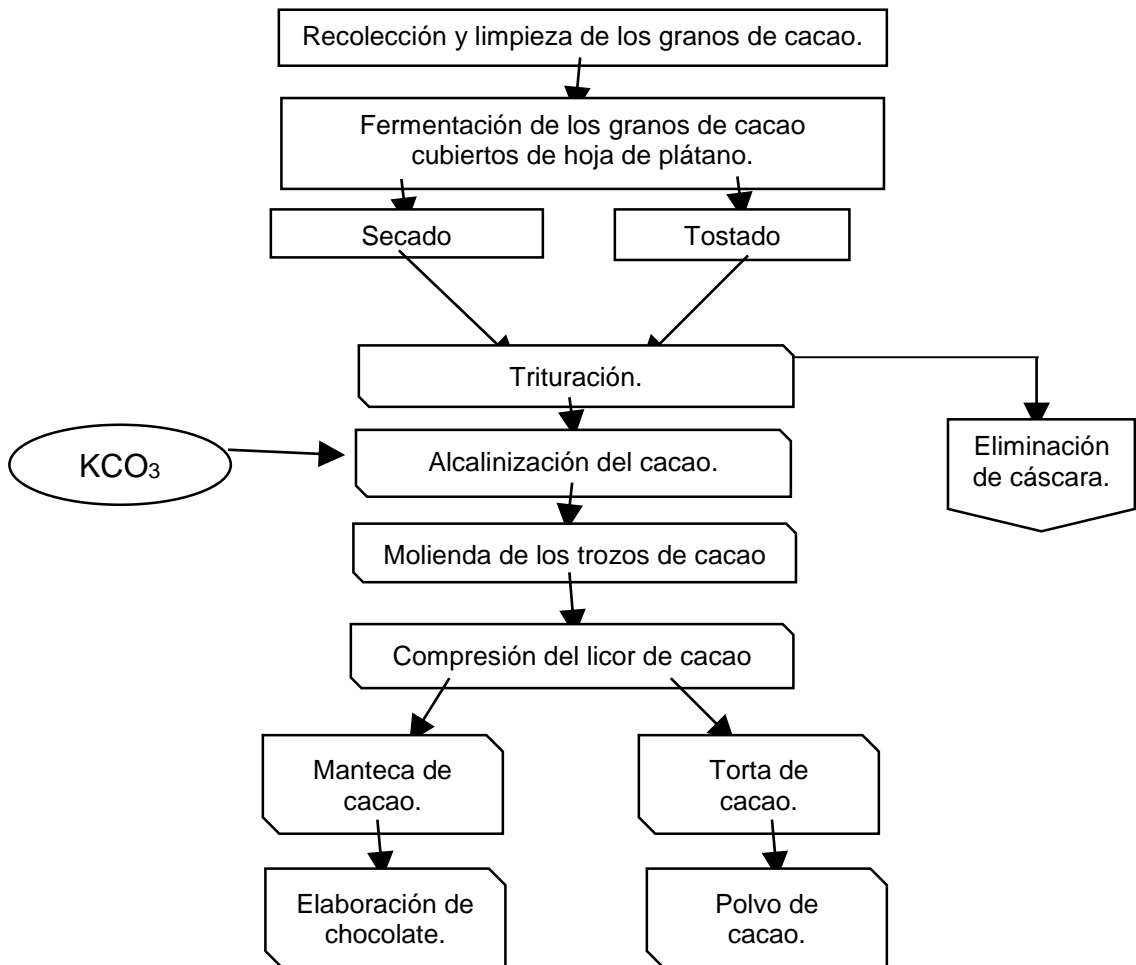
Fuente: "Cocoa Butter and Related Compounds". [Archivo PDF]. 21 de agosto del 2017. Esta es una representación de los triglicéridos de árboles de cacao en diferentes partes del mundo. La imagen no está descrita en su totalidad, solo los triglicéridos que son de interés en la manteca de cacao.

¹ N. Biswas Y. L. Cheow, C. P. Tan, L. F. Siow. Blending of palm Mid-fraction, refined bleached deodorized palm kernel oil or palm stearin for Cocoa Butter Alternative. En Springer Science, 2016, p. 1415-1427.

² Nissim Garti, Neil R. Widlak. Cocoa Butter Related Compounds, Aocs Press. Junio, 2012, p. 14 – 15.

“La manteca de cacao es la responsable de características importantes en el chocolate como la dureza, la fusión rápida y completa por debajo de la temperatura corporal, el brillo y la vida útil”³, siendo también esta grasa polimorfa la responsable del costo en el chocolate, lo que la vuelve significativa y valiosa en el mercado. Su obtención está representada en el diagrama 1.

Diagrama 1. Obtención de la manteca de cacao



1.1.1 Polimorfismo y fase de la manteca de cacao. El Polimorfismo y fase en la manteca de cacao se ha examinado por medio de calorimetría de barrido (DSC) y difracción de rayos X (XRD). Se encontraron alrededor de tres especies básicas, las cuales se asocian a la cristalización de triacilgliceroles monoinsaturados y están clasificadas como alfa, beta y beta prima (α , β y β').⁴ La forma tipo α

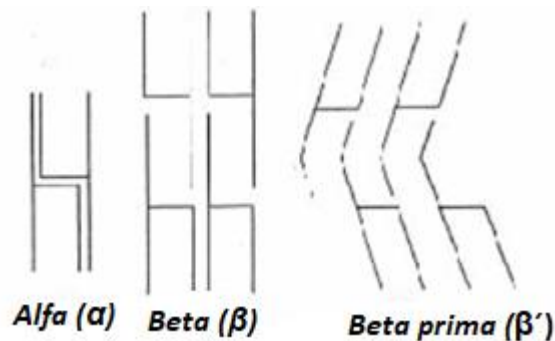
³ Melina Codini, Florencia Díaz Velez, Ines Villavicencio, Mariana Ghirardi. Extraction and Applications of Cocoa Butter. En Revista de investigación académica Dialnet. 2004, p. 143 – 148.

⁴ C. Loisela, b, G. Kellera, G. Lecqb, C. Bourgauxc, and M. Ollivona. Phase Transitions and Polymorphism of Cocoa Butter. En JAOCS Vol. 75 no. 4, 1998 p. 425-439.

propone una mezcla grasa líquida la cual tiene un punto de fusión alrededor de 23°C. La forma β se observa cuando la fracción se funde y se solubiliza en la fase líquida a 37.5°C, para la fase β' , se hace un aislamiento de los cristales, obteniendo un punto de fusión de 50°C.⁵

“La característica distintiva que tiene la manteca de cacao en su composición hace que tenga un comportamiento térmico y estructural similar a la de un componente puro. Este comportamiento no es simple ya que la mayoría de los triglicéridos que la componen muestran un polimorfismo complejo”⁶; lo que significa que cualquier especie puede solidificar en varias formas cristalinas, cada una teniendo propiedades físicas independientes como punto de fusión y morfología. En la imagen 1 se encuentra una representación polimórfica de la estructura cristalina de la manteca de cacao.

Imagen 1. Estructura cristalina de la manteca de cacao.



Fuente: “Polymorphic Crystal Structures Found in Cocoa Butter”. Incline.gr. 21 de agosto del 2017. <http://www.bdigital.unal.edu.co/1058/1/jhonjavermontoyabuitrago.2003.pdf>

1.1.2 Cristalización de la manteca de cacao. Durante el proceso de cristalización de la grasa, la manteca de cacao evoluciona progresivamente desde una sustancia completamente líquida hasta una grasa mayormente solidificada. “Por medio del potencial de una técnica de reflexión por cizallamiento ultrasónico se puede determinar el proceso de cristalización de la manteca de cacao pura, con mediciones a diferentes temperaturas (18°C y 20 °C), la técnica es capaz de detectar diferencias en el comportamiento de cristalización, las mediciones a 18 °C muestran oscilaciones más rápidas comparadas con las mediciones a 20 °C”.⁷ Se indica el rango de temperatura con el que inicia la cristalización para realizar un modelo teórico que se ajuste a la temperatura óptima de cristalización de la manteca de cacao.

⁵ Ibid.,p.426.

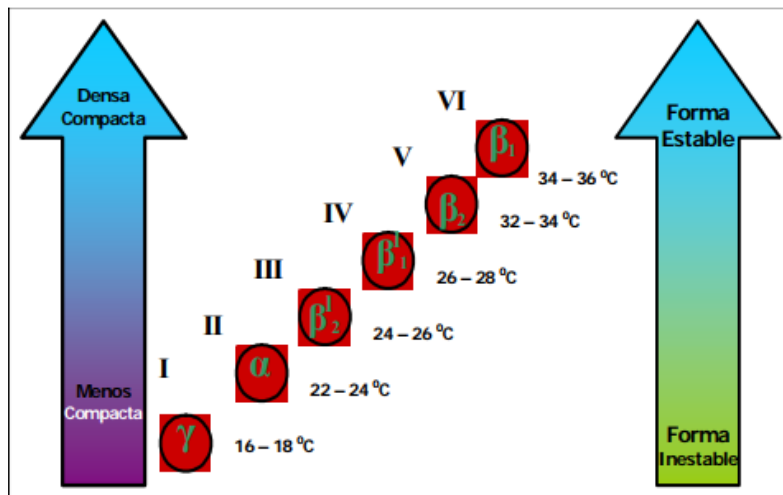
⁶ Jhon Javier Montoya Buitrago, Estudio de la formación de BLOOM en el chocolate mediante técnica de difracción de rayos X, Manizales, Universidad Nacional de Colombia, 2003.

⁷ Annelien Rigolle, Imogen Foubert, Jan Hettler, Erik Verboven, Ruth Demuyndck, Koen Van Den Abeele. Development of an ultrasonic shear reflection technique to monitor the crystallization of cocoa butter. En Food Research International, Vol.75, 2015, p. 155-122.

Según la estructura que posee la grasa, se vuelve más densa cuando tiene un contenido alto de energía, pero cuando el contenido es bajo, se torna menos estable y se vuelve difícil de fundir, esto debido a que las diferentes moléculas de grasa pueden encajar entre sí de diferente manera.

Debido a la composición relativamente homogénea de los triglicéridos, “la manteca cristaliza en una estructura altamente ordenada. Esta característica es la responsable de su dureza y comportamiento durante la fusión.”⁸ No obstante las diferencias no son muy notables en la simetría de las cadenas, generan un polimorfismo complejo que va desde las formas más inestables hasta las que pueden mantenerse inalteradas durante largos períodos de tiempo dependiendo de la zona de cristalización en la que se encuentre. En la imagen 2, se establece una relación de las temperaturas con las formas de cristalización más estable, donde se observa que “las formas de cristalización más estables son las más densas y que entre más altas sean las temperaturas el chocolate cambiará su forma de cristales”⁹, aunque la manteca de cacao quede líquida a temperatura ambiente.

Imagen 2. Temperatura de cristalización de la manteca de cacao.



Fuente: Escuela superior Politécnica del Litoral “Temperatura de cristalización de la manteca de cacao”. Incline.gr. 21 de agosto del 2017. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4401/1/6921.pdf>

1.1.3 Contenido de sólidos grasos en la manteca de cacao. La relación que se presenta entre el grado de cristalización y el contenido de sólidos grasos resulta de vital importancia al analizar la manteca de cacao. “El contenido de sólidos grasos presentes a la temperatura de 20 – 25°C indica dureza, entre los 25 – 30°C

⁸ Melina Codini, Florencia Díaz Velez, Ines Villavicencio, Mariana Ghirardi. Extraction and Applications of Cocoa Butter. En Revista de investigación académica Dialnet. 2004, p 143 – 148.

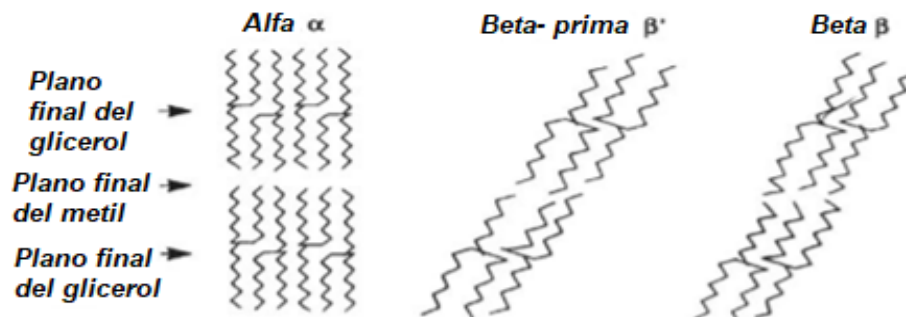
⁹ Gisella Alexandra Perez Lara. Mejora en el proceso de temperado del chocolate, Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del Litora.2006. p. 27.

alude a la resistencia al calor, entre los 30 – 35°C conduce a la rapidez de fusión del CB, finalmente, cuando se trabaja con temperaturas mayores a los 35°C, se relacionan con grasas para confitería, en cuanto a la sensación de grasa que no funde en la boca”.¹⁰

Las grasas con un mismo punto de fusión pueden tener apariencias completamente diferentes a temperatura ambiente, el estado físico de una grasa se refleja mejor por el perfil del contenido de grasa sólida a diferente temperatura, por esta razón, la correlación entre Contenido de Grasa Sólida-propiedades sensoriales es muy importante. Para que no exista información a base de apariencias, se realiza sobre la muestra, el experimento de curva de sólidos para así corroborar datos de contenido de sólidos grasos en diferentes temperaturas, de la manteca de cacao.

1.1.4 Fusión de la manteca de cacao. Debido a que las diferentes formas polimórficas tienen diferentes rangos de fusión;¹¹ se encuentra entre dichos rangos; la zona alfa que tiene una simetría hexagonal y se forma a baja temperatura con altas velocidades de enfriamiento, tienen una corta duración, de 10 s a 2 h, por otro lado, la forma beta, es estable; tiene un punto de fusión más alto que la zona alfa y una simetría tricíclica como se puede observar en la imagen 3; donde todas las cadenas de ácidos grasos están en el mismo plano; especial de la manteca de cacao.¹²

Imagen 3. Proyección de cadenas para polimorfos α , β' y β .



Fuente: Cocoa Butter Related Compounds, “Projection showing arrangement of alkyl chains for α , β' y β polymorphs”. [Archivo PDF]. 21 de agosto del 2017.

¹⁰ CUAMBA GAONA, Raquel. Caracterización de grasas alternativas de la manteca de cacao. México D.F. Tesis (Maestro en Ciencias con especialidad en alimentos). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de graduados e investigación en alimentos, p. 16

¹¹ F. Debaste, Y. Kkegelaers, S. Liégeois, H. Ben Amor, V. Halloin. Contribution to the modelling of chocolate tempering process. En Journal of food engineering. Vol. 88, no 4, 2008. p. 568-575.

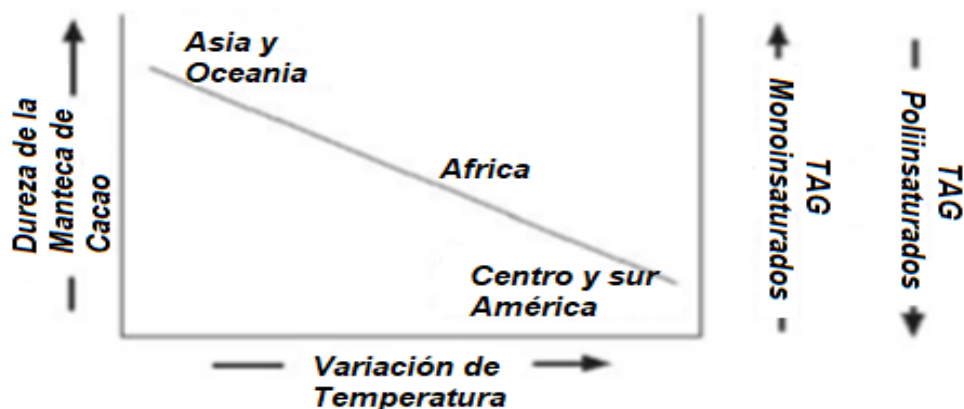
¹² CUAMBA GAONA.Op.cit., p. 28-30.

1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA MANTECA DE CACAO

Las características físicas del chocolate como el brillo, resistencia al calor, sabor y textura se ven afectadas por la estructura de la manteca de cacao, específicamente el tamaño y los tipos de cristales presentes; El tamaño de partícula está inversamente relacionado con la textura y color, proporcionando mayores efectos en la dureza, pegajosidad y ligereza en todos los regímenes de templado. El comportamiento de un sustituto de la manteca de cacao debe ser muy similar a la manteca de cacao, con el fin de lograr la misma sensación y, si la manteca de cacao sólo se sustituye en parte, la adición de la grasa no debe alterar seriamente la cristalización y el comportamiento de fusión.¹³

Por otro lado la temperatura es de vital importancia en la obtención de la manteca de cacao, como ya se había mencionado anteriormente, sus relaciones de triacilglicerol dependen del origen que tenga el cacao, por lo tanto, “a temperaturas más altas se aumenta el nivel de ácido palmítico, ácido esteárico y TAG monoinsaturado y disminuye el nivel de TAG diinsaturados”.¹⁴ Para el año 1989, dos investigadores llamados Chaiseri y Dimick “propusieron mantecas de cacao “duras” originarias de regiones con clima uniforme y cálido durante todo el año (temperatura variando de 20 a 30 ° C y humedad constante) como en Asia y Oceanía. Por el contrario, las mantecas de cacao de América Central y del Sur a menudo son más suave, ya que las temperaturas pueden caer a unos 10 ° C durante las frías noches de invierno”.¹⁵ Dicha información se especifica claramente en la imagen 4.

Imagen 4. Relación entre la pureza y la variación de temperatura con el país de origen.



Fuente: Cocoa Butter Related Compounds, “Schematic representation of the relationship between cocoa butter hardness, mono- and polyunsaturated TAG, country of origin and temperatura variation during pod maturation”. [Archivo PDF]. 21 de agosto del 2017.

¹³ Aleksandra Torbica, Biljana Pajin, Radovan Omorjan. Influence of Soft Cocoa Butter Equivalents on Color and Other Physical Attributes of Chocolate. En Springer Science, 2011

¹⁴ Nissim Garti, Neil R. Widlak. Cocoa Butter Related Compounds, Aocs Press. Junio, 2012, p. 249 – 250

¹⁵ *Ibíd.*, p. 250 – 255.

1.3 ALTERNATIVAS DE LA MANTECA DE CACAO

Las alternativas de manteca de cacao (CBA) son grasas vegetales y pueden consistir en aceite de palma, manteca de karité, grasa de sal, grasa de kokum y grasa de grano de mango.¹⁶ Estas alternativas están divididas en diferentes categorías según su funcionalidad y similitud con CB. El primer grupo recoge los equivalentes de manteca de cacao (CBE); los cuales tienen características fisicoquímicas similares a las CB y son, por tanto, compatibles con CB.¹⁷ De este sustituto según la reglamentación europea, se puede usar un 5% de la masa total sin que el producto pierda su designación como chocolate.

El segundo grupo denominado CBS, se derivan de las grasas láuricas. Las principales materias primas en este grupo son los aceites de palmiste y de coco, siendo el primero la preferencia; “aunque no tienen compatibilidad con la manteca de cacao, tienen un perfil de fusión semejante. La combinación de un contenido muy alto de grasa sólida a 20 °C, un punto de fusión bajo y una buena estabilidad oxidativa hace de la estearina hidrogenada de palmiste una grasa excelente para confitería”.¹⁸ Los sustitutos del chocolate no son producidos en masa sino en polvo, debido a esto, no tienen el sabor intenso y fuerte del chocolate verdadero.

El tercer grupo denominado CBR, se formulan a partir de grasas no láuricas como los aceites de soya, colza, palma, semilla de algodón y girasol. “La producción de este tipo de grasa implica hidrogenación parcial y fraccionamiento. Puesto que los CBR toleran hasta 25-30 % de manteca de cacao, se puede utilizar masa de cacao en la formulación afín de dar un buen sabor total de chocolate a los productos”¹⁹. La principal razón para utilizar CBR es por su precio más bajo que el de la manteca de cacao. “Los elevados precios del cacao se están convirtiendo en una de las principales razones por las que los chocolateros o quienes usan esta materia prima están optando por alternativas más baratas”.²⁰ Sin embargo, contienen un alto porcentaje de ácidos grasos trans y la gente podría evitarlos debido a un posible impacto nocivo para la salud. En la tabla 2 se encuentra más específica la información descrita anteriormente, incluyendo cristalización, compatibilidad con la manteca de cacao, composición de TAG, el origen, el proceso que se le hace a cada uno para la obtención y las aplicaciones que tienen cada una de las alternativas a la manteca de cacao.

¹⁶ Ganesh S. Vidhate, Rekha S. Singhal. Extraction of cocoa butter alternative from Kokum (*Garcinia indica*) Kernel by three phase partitioning. En *Journal of food engineering*, Vol. 117, 2013, p. 464 – 466.

¹⁷ Nathalie De Clercq, Sheida Kadaviar, Sara De Pelsmaeker, Xavier Ghelleyck, Koen Dewettinck. Funtionality of cocoa butter equivalents on chocolate products. En *Springer*, Vol. 243 2017, p. 309-321

¹⁸ Marc Hendrix, Véronique Gibon, Gijs Calliauw. Adding Value to Palm and Palm Kernel Oils with Fat Modifications. En revista *Palma*. Vol 37. N° Especial. 2016.p. 173 – 183.

¹⁹ *Ibid.*, p. 173 – 183.

²⁰ Kawter Albader. Healthier chocolate profile, consumer demand challenge cocoa butter alternative suppliers. En *Editorial Intern*. 01 July. 2012.

Tabla 2. Clasificación de las Alternativas a la Manteca de Cacao (CBA)

	CBE	CBR	CBS
Origen	Aceite de Palma Grasa salada Manteca de karité Manteca de coco	Aceite de Palma Aceite de soya Aceite de canola Aceite de algodón	Aceite de almendra Aceite de coco
Transformación	Hidrogenación Fraccionamiento Interesterificación	Hidrogenación Fraccionamiento	Hidrogenación Fraccionamiento
Composición TAG	Similar al CB	Diferente del CB	Diferente del CB
Ácido láurico	No láurico	No láurico	Láurico (45-55% de ácido láurico)
Compatibilidad con CB	Compatible	Compatible en pequeñas proporciones	Incompatible
Cristalización	Templado para obtener una forma polimórfica estable	Cristalizar directamente la masa fundida en la forma polimórfica estable	Cristalizar directamente la masa fundida en la forma polimórfica estable
Aplicación	*5% de sustitución del producto total * Compuesto	Compuesto	Compuesto

Fuente: Cocoa Butter Related Compounds, "Classification of Cocoa Butter Alternatives (Norberg, 2006; Stewart and Timms, 2002; Talbot, 2009; Timms, 2003". [Archivo PDF]. 21 de agosto del 2017.

1.3.1 Equivalente de la manteca de cacao. El CBE es un tipo de grasa con características químicas y físicas similares a la manteca de cacao, constituida por triglicéridos mono insaturados simétricos del tipo POP: triacilglicérido 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-gliceril, POS: 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoil-glicerol y SOS: 1,3-diestearoil-2-oleoil-glicerol (en donde P, O y S son representados por ácido palmítico, ácido oleico y ácido esteárico, respectivamente). "Se puede mezclar con la manteca de cacao sin alterar significativamente las propiedades de fusión, presenta mejor resistencia al calor y mejor comportamiento de fusión que la propia manteca de cacao."²¹

"La única diferencia entre un equivalente de manteca de cacao típico y la manteca de cacao es la relación de TAG simétrico. Los CBE's contienen niveles más altos de SOS y POP que CB debido a que las fuentes disponibles de grasas SOS son fraccionadas enzimáticamente"²².

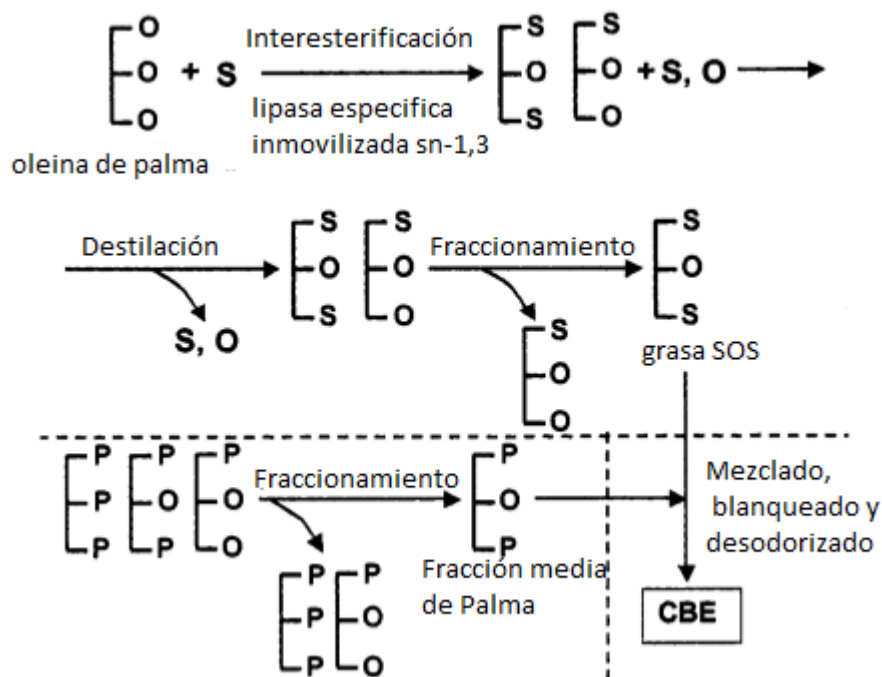
²¹ XUEBING Xu. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark. En: European Journal of Lipid Science and Technology (2010); p. 287-303.

²² Casimir C. Akoh, Oi-Ming Lai; Healthful Lipids, Aocs PRESS, Illinois; September 14, 2004.p. 643-650

La obtención de CBE por medio de interesterificación enzimática, tiene grandes ventajas; entre ellas, “las materias primas están fácilmente disponibles, por lo tanto el suministro y el precio es estable; la calidad del CBE producido por el método de interesterificación enzimática es bastante estable debido a la calidad de los aceites de la materia prima y a la reacción de interesterificación enzimática ajustable.”²³ Estas ventajas evitan un coste de procesamiento excesivo.

“La interesterificación enzimática es catalizada por una lipasa inmovilizada con niveles muy bajos de humedad, generalmente, la lipasa funciona como el catalizador de la hidrólisis y divide el TAG en FA y MAG.”²⁴ La interesterificación enzimática y el proceso de producción de CBE se resumen en la imagen 5.

Imagen 5. Esquema del CBE mediante interesterificación enzimática.



Fuente: Casimir C. Akoh, Oi-Ming Lai; Healthful Lipids. “The process scheme of CBE by enzymatic interesterification.”. [Archivo PDF]. 21 de agosto del 2017.

“Aunque el CBE es menos costoso, también sustituye algunas falencias que tiene el CB como lo es una mejor resistencia a la floración del chocolate y un mejoramiento en la resistencia al calor en el chocolate”²⁵ Cuando se le agrega el

²³ Casimir C. Akoh, Oi-Ming Lai; Healthful Lipids, Aocs PRESS, urbana illinions; September 14, 2004. Pg. 644-664.

²⁴ Ibíd., p. 644-664.

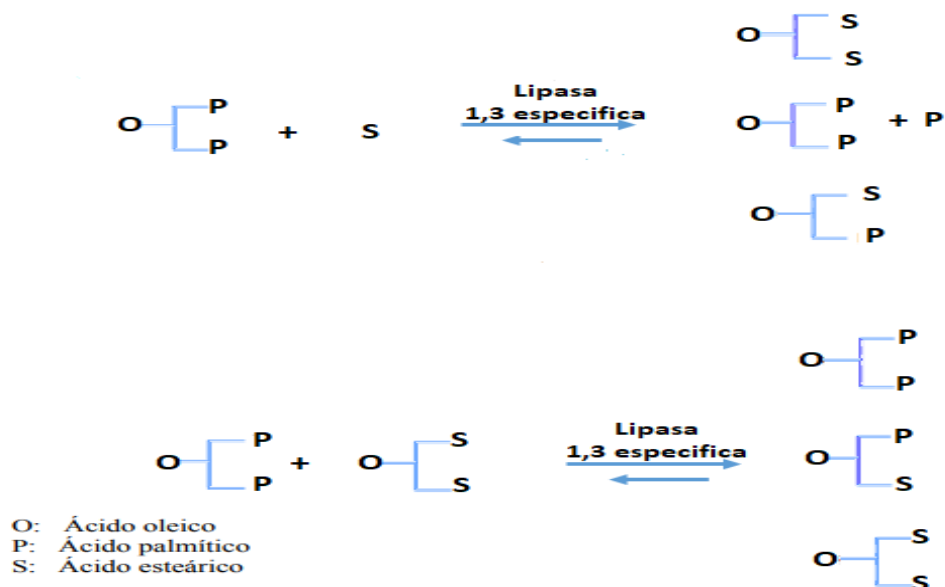
²⁵ Casimir C.Op.cit., p.644-664.

5% permitido por la reglamentación Europea a la manteca de cacao la aparición de floración se ve retrasada.

1.4 REACCIÓN DE INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA

La reacción de interesterificación enzimática consiste en el intercambio de ácidos grasos de diferentes moléculas de TAG's, gracias al uso de la lipasa específica inmovilizada sn-1,3 como catalizador de la reacción, como se muestra en la imagen 18 permitiendo el reordenamiento específicamente en las posiciones 1 y 3 de las cadenas de los triglicéridos por lo que puede inducir a la formación de nuevos productos, por ejemplo, la producción de equivalentes de manteca de cacao (CBE).

Imagen 6. Reacción de interesterificación enzimática.



Fuente: JÁCOME REYES, Luis Fernando. Evaluación de la enzima Lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales. Trabajo de grado. Químico. Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. 2004. p.47

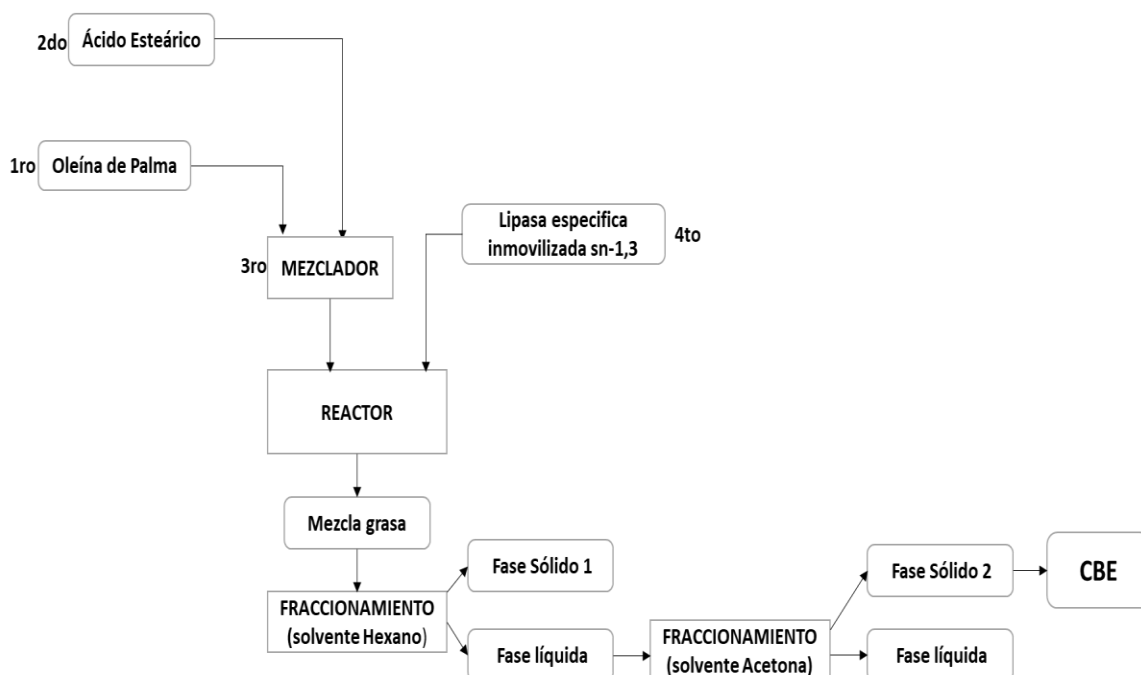
2. DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL CBE

El propósito de este capítulo es la determinación de las variables que influyen en el proceso de obtención del CBE realizando ensayos preliminares, para ello se hizo una búsqueda bibliográfica en la cual se obtuvieron artículos, tesis y patentes con la ayuda de bases de datos como Espacenet y Springer Science en las cuales se especifican las variables utilizadas en la reacción enzimática para la producción del CBE.

Una vez obtenida la información se efectúan los ensayos preliminares con el fin de conocer la influencia que tienen las variables involucradas en el sistema y comprobar si el sistema en el que se realiza esta investigación es similar respecto a los porcentajes de triglicéridos encontrados en las experimentaciones anteriores principalmente POP, POS y SOS, estableciendo así las variables a usar tales como relación p/p de las materias primas, Temperatura, tiempo de reacción, agitación y cantidad de enzima.

El proceso de obtención del CBE (diagrama 2) se evalúa mediante una reacción de interesterificación enzimática a nivel laboratorio, este proceso hace que se produzca un reordenamiento en la cadena de los triglicéridos debido a que la enzima utilizada tiene una especificidad por los ácidos grasos ubicados en las posiciones sn-1 y sn-3 del TAG, esto con el fin de obtener una grasa especial que tenga características semejantes a la manteca de cacao (%POP, %POS y %SOS).

Diagrama 2. Proceso para la obtención del CBE



2.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realiza una búsqueda bibliográfica con la descripción de cada una de las fuentes consultadas para la determinación de las variables a trabajar en el desarrollo del proyecto, (relación p/p; Temperatura; % enzima; Agitación y tiempo de reacción). Las fuentes a trabajar en artículos incluyen bases de datos como Springer Science, Elsevier y JAOCS, en patentes se usaron bases de datos como Espacenet y en Tesis, bases de datos como DIALNET y colecciones digitales.

2.1.1 Artículos informativos para la obtención del Equivalente de manteca de cacao

2.1.1.1 Lipase-Catalyzed Acidolysis of palm Mid fraction Oil with palmitic and stearic fatty Acid Mixture for production of Cocoa Butter Equivalent, del autor Ibrahim O. Mohamed. La investigación consistió en el empleo de un reactor discontinuo para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; una fracción media de palma y una mezcla de ácido palmítico y ácido esteárico (40% palmítico, 57% esteárico). Estas materias primas se mezclaron en relación 1:2, (1 de fracción media de palma; 2 de mezcla palmítico y esteárico), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 10% de la masa total, la enzima se preparó en una solución saturada de NaCl durante 24 horas previamente a la reacción enzimática, con el fin de lograr una mayor activación de esta; durante el proceso, se empleó una temperatura de 60°C y agitación de 160 RPM (Revoluciones por minuto), toda la reacción se llevó a cabo en un tiempo de 3 horas.

La tabla 3, hace referencia al porcentaje de masa normalizado de 5 TAG's importantes en la manteca de cacao, donde se concluye que la columna utilizada para la lectura de los datos produjo una excelente representación del valor del certificado del material de referencia estándar.

Tabla 3. Certificado de referencia de los mayores TAG (%) del material utilizado (fracción media de palma) (g/100g)

TAG	certificado	Este estudio	Fracción media de Palma
POP	18.14	18.69 ^a ±0.02 ^b	55.58 ^a ±0.17 ^b
POS	44.68	44.85±0.06	10.40±0.07
POO	2.26	2.39±0.06	29.78±0.08
SOS	31.63	30.74±0.03	1.33±0.01
SOO	3.29	3.31±0.01	2.92±0.01

Fuente: Lipase-Catalyzed Acidolysis of palm Mid fraction Oil with palmitic and stearic fatty Acid Mixture for production of Cocoa Butter Equivalent.

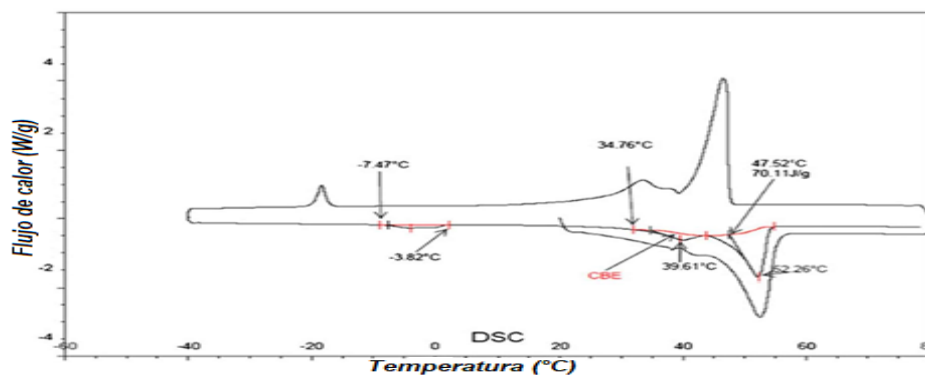
Los resultados obtenidos en la investigación fueron cercanos a la composición de la manteca de cacao para una relación 1:2, donde se obtuvieron TAG para el

POP: 30,7%, POS: 40,1%, POO: 9,0%, SOS: 14,5%, SOO: 5,7%. La reacción alcanzó una conversión de POP y POO 44,7 y 69,7% respectivamente y el rendimiento fue mayor que el 100% para TAG como POS y SOS. “Según los datos conseguidos, el producto podría ser usado como CBE, una vez se recupere este, ya sea con una separación o con una cristalización”²⁶.

2.1.1.2 Lipase-Catalyzed synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and saturated fatty acid Distillate from palm Oil Physical Refinery, del autor Ibrahim O. Mohamed. La investigación en el artículo consistió en el empleo de un reactor Batch para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; una fracción media de palma y una mezcla de ácido palmítico y ácido esteárico (40% palmítico, 57% esteárico). Estas materias primas se mezclaron en **relación 1:3**, (1 de fracción media de palma con 3 de mezcla palmítico y esteárico), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 10% de la masa total, la enzima se preparó en una solución saturada de NaCl durante 24 horas previamente a la reacción enzimática, con el fin de lograr una mayor activación de esta; durante el proceso, se empleó una **temperatura de 60°C** y agitación de 160 RPM (Revoluciones por minuto), toda la reacción se llevó a cabo en un tiempo de **3 horas**.

La técnica DSC (Differential scanning Calorimetry) es comúnmente usada para estudiar el comportamiento de fusión de una mezcla grasa. En esta investigación, se obtuvo un termograma para la relación 1:3 entre una fracción media de palma y una mezcla de ácido palmítico y ácido esteárico (40% palmítico, 57% esteárico), como se observa en la imagen 7.

Imagen 7. DSC Termograma para la estructura de la manteca durante el ciclo de calentamiento y enfriamiento. (PO: PFAM 1:3)



Fuente: Lipase-Catalyzed synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Pam Olein and saturated fatty acid Distillate from palm Oil Physical Refinery, del autor Ibrahim O. Mohamed.

²⁶ Ibrahim O. Mohamed, Lipase-Catalyzed Acidolysis of Palm Mid Fraction Oil with palmitic and Stearic Fatty acid Mixture for production of Cocoa Butter Equivalent. En Springer Science, 2013, p. 655-666.

En la imagen hay tres picos endotérmicos, el primero tiene una temperatura de fusión inicial de $-7,47^{\circ}\text{C}$ y temperatura de fusión máxima de $3,82^{\circ}\text{C}$ representa un mono o diglicerido de bajo punto de fusión; el segundo está con un rango de $34,76^{\circ}\text{C}$ a $39,61^{\circ}\text{C}$, el cuál es el rango típico para la manteca de cacao, el tercer pico, con un rango de $47,52^{\circ}\text{C}$ a $52,26^{\circ}\text{C}$, favorece a los ácidos grasos sin reaccionar²⁷.

Los resultados obtenidos en la investigación fueron cercanos a la composición de la manteca de cacao para una relación 1:3, dónde se obtuvieron TAG para el POP: 26,6%, POS: 42,1%, POO: 7,5%, SOS: 18,0%, SOO: 5,8%. La reacción alcanzó una conversión de POP y POO 35,3 y 83,7% respectivamente y el rendimiento fue mayor que el 100% para TAG como POS y SOS. “Según los datos conseguidos, el producto podría ser usado como CBE, una vez se recupere este, ya sea con una separación o con una cristalización”²⁸.

2.1.1.3 Enzymatic Transesterification of Palm Olein for the Production of Special Fats in a Batch Type Reactor. De los autores Luz M. Arango, Nelson Moreno, Carlos Pareja, Fernando Martínez y Aidé Perea. La investigación en este artículo consistió en el empleo de un reactor de tipo Batch para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; Oleína de palma y ácido esteárico (98,3 % esteárico). Estas materias primas se mezclaron en **relación 1:0,7**, (1 de fracción media de palma con 0,7 de ácido esteárico), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 30% de la masa total, la enzima no tuvo una previa preparación; dando a entender en el experimento que entre mayor sea la cantidad de enzima, mayor los porcentajes de algunos TAGs en el resultado final de la reacción; durante el proceso, se empleó una **temperatura de 70°C** , toda la reacción se llevó a cabo en un tiempo de **12 horas**, tomando muestras cada media hora en las primeras dos horas y cada hora durante las siguientes 10 horas.

Posteriormente a la reacción se llevó a cabo un fraccionamiento en seco, del cual se obtuvieron dos fases; F1 y F2, la primera fase fue semilíquida aumentando el porcentaje de POP, POS y POO. Triglicéridos como POS y SOS se mantuvieron constante con respecto a la obtenida en el producto interesterificado; la segunda fase contiene cantidades apreciables de otros TAG saturados como PPP, PPS y SSS que le imparten al producto una consistencia sólida a temperatura ambiente; dichos valores son apreciables en la tabla 4.

²⁷ Ibrahim O. Mohamed Lipase-Catalyzed synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and saturated fatty acid Distillate from palm Oil Physical Refinery. En Springer Science, 2013 Pg 1405 – 1415.

²⁸ *Ibid.*, p.1405 – 1415.

Tabla 4. Composición (%) en triglicéridos del producto interesterificado sin fraccionar y el de sus fracciones.

TAG	Composición (%) ^a			
	OP+HTP sin reaccionar	PJ ^b	F1	F2
DAG ^c	0,8	7,3	6,5	4,5
PPP	3,6	4,8	4,0	8,7
PPS	8,5	9,0	3,9	15,8
POP	22,5	17,9	26,4	15,1
POS	4,0	12,1	12,9	7,7
POO	21,6	13,2	17,8	9,5
SSS	5,9	2,7	0,7	6,1
SOS	0,4	3,0	2,8	2,3

Fuente: Enzymatic Transesterification of Palm Olein for the Production of Special Fats in a Batch Type Reactor. De los autores Luz M. Arango, Nelson Moreno, Carlos Pareja, Fernando Martínez y Aidé Perea.

“La reacción que se realizó de transesterificación enzimática permite modificar la composición en triacilglicéridos de la mezcla, obteniéndose un producto con características físicas y químicas diferentes a las de la mezcla inicial. Sin embargo, la formación de SOS es baja y limita su aplicación como equivalente de la manteca de cacao”²⁹.

2.1.1.4 Fractionation produces for obtaining cocoa butter- like fat from enzymatically interesterified Palm Olein. De los autores C.N. Chong, Y.M. Hoh, C.W. Wang. La investigación en este artículo consistió en el empleo de un reactor discontinuo de vidrio con capacidad de 5L, para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; Oleína de palma y ácido esteárico (98,3 % esteárico). Estas materias primas se mezclaron en **relación 1:0,5** relación p/p. (1 de oleína de palma con 0.5 de ácido esteárico), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 10% de la masa total, la enzima estaba inmovilizada; durante el proceso, se empleó una **temperatura entre los 60°C - 70°C**, toda la reacción se llevó a cabo en un **tiempo de 20 horas**, se utilizó una agitación mecánica de 200 rpm.

Posteriormente a la reacción se realizó tres diferentes tipos de fraccionamiento, a los cuales nombró; procedimiento A, B y C. El procedimiento A, se hizo con una relación 1:10 (p/v) dónde se agregó la mezcla con hexano por 24 horas a una temperatura de 4°C, se hizo una filtración de la cual salieron dos fases, la fase 1 (liquida) se le agrega acetona en la misma relación por el mismo tiempo y a la misma temperatura, se realiza el proceso de filtración nuevamente y se obtiene una fase de interés sólida llamada F3(A). El fraccionamiento del procedimiento B se realiza el mismo procedimiento del A, con la diferencia de que la relación

²⁹ Luz M. Arango, Nelson Moreno, Carlos Pareja, Fernando Martínez, Aidé Perea. Enzymatic Transesterification of Palm Olein for the Production of Special Fats in a Batch Type Reactor, en Revista Palmas, 2004. Vol 25, No especial. Tomo I. p. 370 – 375.

disminuye a 1:5 (p/v). El fraccionamiento del procedimiento C, se realiza con relación 1:10 (p/v), donde la solución en la primera parte es dejada a 25°C por 24 horas para obtener una primera fracción, denominada fracción 1. F1(C), esta fracción, se lleva a un proceso de filtración de la cual salen dos fases, una líquida y una sólida; se pone la muestra líquida a 4°C por 24 horas en acetona, para su posterior filtración y así obtener F3(C). Los resultados de la anterior información se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de diversas fracciones (F1, F2, F3) de oleína de palma interesterificada obtenida mediante diferentes procedimientos de fraccionamiento con disolventes. (A B C)

Fracción	Triglicéridos (%)													
	OOL	POL	PPL	OOO	POO	POP	PPP	SOO	POS	PPS	SOS	SPS	SSS	
<i>Oleína de palma interesterificada</i>	10.2	1.6	4.7	1.9	2.1	12.2	9.9	1.8	9.5	18.6	5.8	10.8	7.4	3.5
F1(A) ^b	16.4	0.3	0.3	0.4	—	1.3	3.5	5.8	1.0	9.1	20.1	6.8	24.2	10.8
F2(A) ^b	0.9	0.4	1.4	0.1	—	2.3	15.3	1.0	2.9	44.1	—	29.6	0.5	1.5
F3(A) ^b	14.3	0.8	9.8	3.4	4.8	25.9	9.7	—	17.7	8.7	—	1.9	—	—
F1(B)	13.1	—	0.3	0.4	—	0.7	2.9	5.4	0.6	7.7	20.3	6.8	28.8	13.0
F2(B)	3.3	0.7	2.1	2.5	0.8	6.0	16.0	—	6.1	38.7	—	23.1	—	0.7
F3(B)	15.6	4.1	10.4	3.4	5.2	26.8	7.8	—	19.0	6.2	—	1.5	—	—
F1(C)	2.7	0.4	1.0	0.6	0.5	2.9	3.6	5.0	2.4	8.9	21.1	8.1	29.4	13.4
F2(C)	9.9	0.7	1.5	0.4	—	1.7	13.7	1.9	3.6	38.5	2.6	24.8	—	0.7
F3(C)	13.4	3.5	9.3	3.2	4.4	24.6	10.5	—	17.5	10.9	—	2.7	—	—
<i>Manteca de cacao</i>	1.0	0.2	2.4	—	—	2.2	18.9	—	2.4	41.3	—	29.7	—	1.9

Fuente: Fractionation produces for obtaining cocoa butter-like fat from enzymatically interesterified Palm Olein. De los autores C.N. Chong, Y.M. Hoh, C.W. Wang.

“En conclusión, la oleína de palma interesterificada enzimáticamente es una buena fuente de triglicéridos semejantes a la manteca de cacao, que podrían fraccionarse selectivamente en hexano y acetona para dar un rendimiento de aproximadamente el 25% del peso de la oleína de palma original³⁰. Aunque ninguno de los fraccionamientos representados es específico para la obtención de la manteca de cacao, son de gran importancia para referenciar unos triglicéridos semejantes en la obtención de un equivalente a la manteca de cacao.

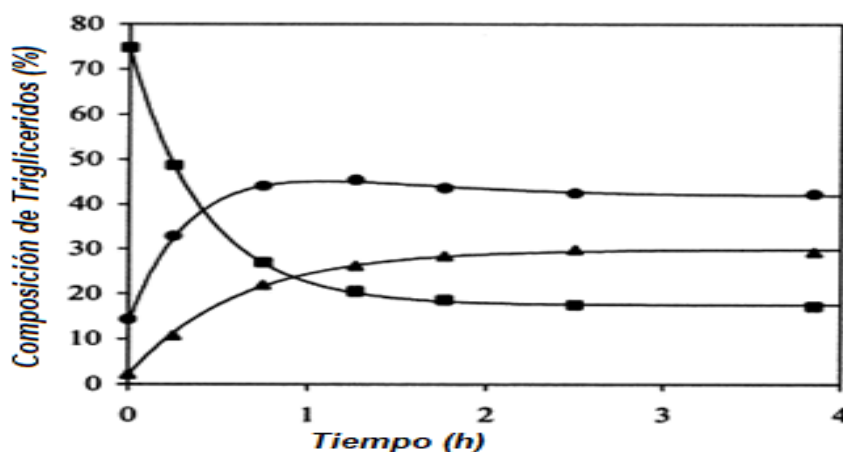
2.1.1.5 Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. Por los autores Daniel Undurraga, Andrés Markovits, Sonia Erazo. La investigación en este artículo consistió en el empleo de un reactor Tipo Batch con capacidad de 5L, para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; Oleína de palma y ácido esteárico (99 % de pureza el ácido esteárico). Estas materias primas se mezclaron en **relación 1:6** relación p/p. (1 de oleína de palma con 6 de ácido esteárico), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 30% de la masa total, la enzima estaba inmovilizada; durante el proceso, se empleó una **temperatura de 65°C**; toda la reacción se llevó a cabo en un **tiempo de 12 horas** con la ayuda de una agitación mecánica.

³⁰ C.N. Chong, Y.M Hoh, C.W Wang. Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like fat form enzymatically interesterified palm olein. En JAOCS. 1992, Vol 6. N° 2.

Para el proyecto de investigación, usaron un diseño factorial de 2^3 dónde las variables fueron la relación (1:2, 1:4, 1:6) y la relación enzima sustrato. En las doce horas que estuvo la reacción, se midió constantemente la humedad para descartar la influencia de porcentaje de agua en el experimento, los otros factores incluidos en el diseño de experimentos se mantuvieron en constante monitoreo para que los valores fuesen los determinados en el diseño de experimentos.

Según la imagen 8 , “se observa que la composición deseada (con un valor SI de 0,52) se alcanza a 1,2 h aproximadamente y se alcanza el equilibrio a un valor SI de 0,56. El tiempo de reacción, el rendimiento y los resultados de productividad se ajustaron a un modelo lineal con interacciones”³¹.

Imagen 8. Transcurso del tiempo de la interesterificación en el experimento 7 del diseño experimental I, Mostrando cambios en la composición de los triglicéridos. POP, POS, SOS.



Fuente: Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. De los autores Daniel Undurraga, Andrés Markovits, Sonia Erazo.

2.1.1.6 Enzymatic Production of Cocoa Butter Equivalents High in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearin in Continuous Packed Bed Reactors. De los autores Sohee Kim – In – Hwan Kim, Casimir C. Akoh, Byung Hee Kim. La investigación en este artículo consistió en el empleo de un reactor Tipo Batch, para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; mezcla grasa con alto porcentaje en ácido oleico (alrededor de 83%) y una mezcla de palmitato de etilo con estearato de etilo. Estas materias primas se mezclaron en **relación 2:3** relación mol/mol. (1 de mezcla de grasa con 83% de oleína de palma con 3 de mezcla de palmitato y estearato de etilo), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 10% de la masa total, la enzima estaba inmovilizada; durante el proceso, se empleó una

³¹ Cocoa Butter Equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. Por los autores Daniel Undurraga, Andrés Markovits, Sonia Erazo. En ELSEVIER, 2001. Vol. 36 Issue 10. p. 933 - 939.

temperatura de 60°C; la reacción tuvo un **tiempo de residencia de 29 minutos**, la cual contó con la ayuda de una agitación mecánica.

El diseño de superficie de respuesta es una aplicación de múltiples modelos de regresión lineal que es útil para investigar y optimizar procesos complejos, tales como reacciones enzimáticas. En este estudio, se aplicó para modelar la transesterificación catalizada por IM de Lipozyme RM de aceite de girasol alto en ácido oleico con palmitato de etilo y estearato de etilo, cuatro aspectos se analizaron en forma detallada, temperatura, tiempo de residencia, radio molar del sustrato y contenido de agua. (Te, RT, SR y WC). No hay variación de los datos en un mayor porcentaje, es decir que el R^2 es mayor a 95% de confiabilidad, y los resultados en las gráficas del artículo demuestran la o tendencia a error.

“Se logró una ampliación exitosa de la reacción bajo las condiciones óptimas. Una cantidad considerable de palmitato de etilo y estearato de etilo permanece sin reaccionar en los productos de reacción y también se formó oleato de etilo como los co-productos principales de la reacción. Por lo tanto, se requerirían más investigaciones sobre la purificación (por ejemplo, proceso de destilación) y caracterización (por ejemplo, propiedades físicas y texturales) del CBE para su posible uso en productos de chocolate”³²

2.1.1.7 Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents. De los autores S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan. El procedimiento en este artículo consistió en el empleo de un reactor discontinuo, para la realización de una interesterificación enzimática con el uso de dos materias primas principales; Oleína de palma y aceite de soja totalmente hidrogenado. Estas materias primas se mezclaron en diferentes **relaciones; 2:1 (A); 1,5:1 (B); 1:1 (C) 1:1,5 (D) 1:2 (E)** relación p/p. (donde el primer dato es de aceite de soja y el segundo de oleína de palma para cada relación), se usó una cantidad de enzima (Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei) del 6% de la masa total, la enzima estaba inmovilizada; durante el proceso, se empleó una **temperatura de 68 - 70°C**; toda la reacción se llevó a cabo en un **tiempo de 4 horas** con la ayuda de una agitación mecánica en 200 rpm.

Una vez terminada la reacción, se hizo un proceso de fraccionamiento con la mezcla grasa obtenida, primero se trabajó con hexano por alrededor de 4 horas a una temperatura de 0 a 4°C, terminadas el tiempo de reacción se filtró la solución, quedando dos fases de la mezcla, una sólida y una líquida; a la líquida se hizo el

³² Sohee Kim – In – Hwan Kim, Casimir C. Akoh, Byung Hee Kim. Enzymatic Production of Cocoa Butter Equivalents High in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearin in Continuous Packed Bed Reactors. J Am Oil Chem Soc. 2014.

mismo proceso de fraccionamiento con acetona, por el mismo tiempo y la misma temperatura, estos fraccionamientos se hicieron con una relación de 5L: 1 Kg.”³³

Los resultados descritos en el artículo para cada una de las relaciones se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.composición de triacylglicerol (área%) de los productos grasos (CBE) a varias relaciones en peso de sustratos (PMF / FHSO)

TAG (%)	Relaciones de peso sustrato (PMF/FHSO)					Manteca de cacao
	A (2:1)	B (1.5:1)	C (1:1)	D (1:1.5)	E (1:2)	
OLO	1.3	1.1	0.6	0.4	0.3	0.8
PLO	3.4	3.0	2.0	1.5	1.2	1.7
PLP	3.4	2.9	2.3	1.9	1.6	0.5
OOO	2.0	1.6	0.9	0.6	0.4	2.2
POO	7.8	6.7	4.3	2.9	2.2	2.3
POP	19.5	16.5	12.8	11.0	9.5	14.8
PPP	1.3	1.2	1.5	1.2	1.4	0.9
SOO	5.5	5.7	4.8	4.1	3.5	2.9
POS	30.1	32.6	35.1	37.5	37.7	36.8
PPS	1.2	1.3	2.0	1.8	2.0	0.7
SOS	9.7	13.3	18.5	22.9	26.0	25.3
PSS	0.4	0.5	1.1	0.9	1.0	0.7
SOA	0.5	0.5	0.7	0.7	0.8	1.5
DAG	5.2	4.4	4.9	3.7	3.4	2.4
Others	8.7	8.7	8.5	8.9	9.0	5.6
St3	2.9	3.0	4.6	3.9	4.4	2.3
St2U	63.2	65.8	69.2	74.0	75.5	78.9
StU2	16.3	15.4	11.1	8.6	6.9	13.8
U3	3.3	2.9	1.5	0.4	0.3	3.0

Fuente: Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents. De los autores S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan.

Siendo la relación 1:2 similar a la manteca de cacao con las condiciones de operación expuestas anteriormente. Cabe resaltar que la imagen 6, posteriormente será usada para la comparación de la manteca de cacao con el Equivalente de Manteca de Cacao obtenido de la experimentación.

2.1.2 Patentes informativas para la obtención del Equivalente de manteca de cacao, (CBE)

2.1.2.1 Method for enzymatic transesterification preparation of cocoa butter equivalent by using 33-DEG C palm oil. De los inventores; DENG LI; LIU MOYAN; NIE KAILI; WANG FANG; HU HUIRONG. La patente describe un método para la preparación de un equivalente a la manteca de cacao por medio de transesterificación enzimática usando aceite de palma 33-DEG. El aceite de palma de 33-DEG es usado como materia prima ya que tiene alta seguridad alimenticia, de igual manera, el ácido esteárico fue parte de la materia prima, en

³³ S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan. Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the Production of cocoa butter equivalents. J Am Oil Chem Soc. 2010.

relación desde **1:1,9 hasta 1:2,2**; respectivamente. La lipasa usada tiene las ventajas de una buena selectividad del sitio Sn-1,3; usando la lipasa (*Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei*) en la invención, entre valores que oscilan entre 8 a 20% de la masa total, la reacción se llevó a cabo a una **temperatura de 50°C** y tuvo un **tiempo de reacción de 150 minutos**. Una vez terminada la reacción, se hizo un proceso de fraccionamiento doble con hexano por alrededor de 6 horas, seguidamente con acetona por la misma cantidad de horas, cada uno a una temperatura de 4°C.

Los resultados entre la patente y la manteca de cacao son semejantes a nivel fisicoquímico como a nivel de composición de triglicéridos. En la tabla 7, se exhiben los resultados obtenidos en la patente de los triglicéridos por cromatografía.

Tabla 7. Composición de triglicéridos de la manteca de cacao y de la investigación realizada.

		<i>Manteca de Cacao</i>	<i>Investigación</i>
<i>Trigliceridos (%)</i>	POP	14.672	13.342
	POS	49.62	50.297
	SOS	33.244	32.225

Fuente: Method for enzymatic transesterification preparation of cocoa butter equivalent by using 33-DEG C palm oil. De los inventores; DENG LI; LIU MOYAN; NIE KAILI; WANG FANG; HU HUIRONG.

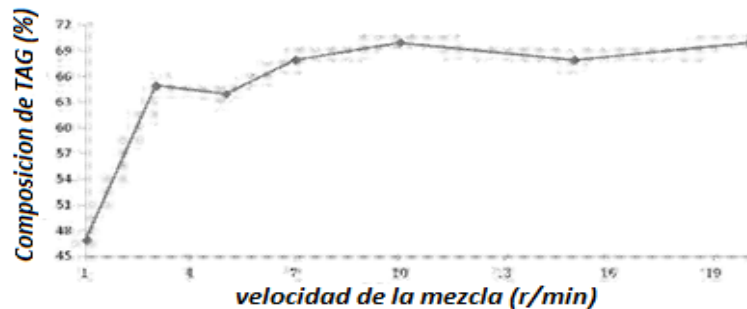
“El índice de acidez es bajo en comparación con la manteca de cacao, el tipo de cambio de éster es alto, la velocidad de transferencia de acilo es baja, la vida útil es larga y el costo es bajo, además, se puede reducir significativamente el valor ácido de la manteca de cacao equivalente para de esa manera prolongar la vida útil del producto”³⁴.

2.1.2.2 Preparation method of Cocoa Butter Equivalent. De los inventores JIN QINGZHE; JIN JUN; WANG XINGGUO. La patente describe un método para la preparación de un equivalente a la manteca de cacao por medio de transesterificación enzimática usando aceite de Nuez de mango con el aceite de palma en una **relación 7:3**; la solución fue mezclada con solvente, methylpentano en relación 1:6 respectivamente. La reacción se llevó a cabo a una **temperatura de 45°C** y tuvo una duración de **4 horas**. Una vez terminada la reacción, se hizo un proceso de fraccionamiento doble con hexano primero por alrededor de 24 horas, seguidamente con acetona por la misma cantidad de horas, la primera parte del fraccionamiento a una temperatura de 2,8°C y 8°C para la segunda parte del fraccionamiento.

³⁴ JIN QINGZHE; JIN JUN; WANG XINGGUO, Preparation method of Cocoa Butter Equivalent, 2016– 08–10.

La imagen 9, hace referencia a la mezcla descrita anteriormente en la patente, donde se observa el cambio de la composición de los triglicéridos más relevantes en la manteca de cacao (POP, SOS, POS) a través de la velocidad.

Imagen 9. Esquema de una etapa de la primera velocidad de mezcla de la presente invención.



Fuente: Preparation method of Cocoa Butter Equivalent. De los inventores JIN QINGZHE; JIN JUN; WANG XINGGUO.

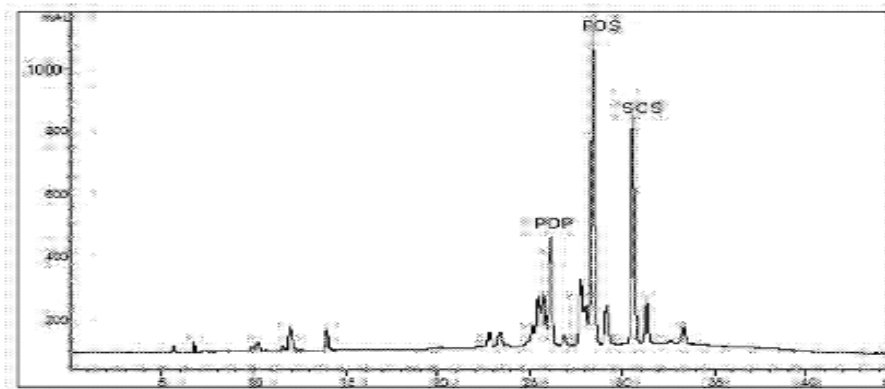
2.1.2.3 Method for continuously preparing cocoa butter equivalent. De los autores WENG XINCHU; WANG SHENGJIE; Z HUO ZHIYANG. La patente describe un método para la preparación continua de un equivalente de manteca de cacao. El método comprende las siguientes etapas: la primera consiste en pesar entre 15-100 g de lipasa especial de 1,3- (*Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei*). La segunda etapa consiste en pesar el extracto intermedio (POMF) de aceite de palma a la temperatura de 28°C, se mezcló el extracto intermedio (POMF) del aceite de palma a la temperatura de 28°C con estearato de metilo o methyl ester. (MS) en **relación de 1: 1-1,2: 1**, después de mezclar, se fundió la mezcla en un horno de secado a una **temperatura de 55°C**, manteniéndose durante **30-40 minutos** y fundiéndose en un líquido fundido; la tercera etapa se tomó 50-500 ml del líquido fundido obtenido de la segunda etapa y 15-100 g de la lipasa especial de la primera etapa, se agitó, y después de agitar uniformemente, se llevó a una columna cromatográfica; “se colocó la columna cromatográfica en el horno de secado a la temperatura de 53-58 ° C y se llevó a cabo la transesterificación; la cuarta y última etapa consistió en fluir el líquido fundido como un sustrato a través de la columna cromatográfica a una velocidad de 2,6-16 g / min, recoger el líquido de reacción goteando después de que el líquido fundido se derramó a través de la columna cromatográfica, se siguió añadiendo continuamente el licor fundido como sustrato al cromatógrafo y de esa forma llevar a cabo la transesterificación para realizar la preparación continua del equivalente de manteca de cacao (CBE)”³⁵.

³⁵ WENG XINCHU; WANG SHENGJIE; Z HUO ZHIYANG, Method for continuously preparing cocoa butter equivalent. 2016-10-26.

Con esta patente, se puede preparar continuamente un equivalente de manteca de cacao sin adición de disolvente; el tiempo consumido para la preparación es corto y el rendimiento de la reacción aumenta con un costo de inversión bajo.

En la imagen 10, se observa el resultado cromatográfico de un resultado de la patente descrita anteriormente, donde se exponen los triglicéridos de interés, (POS, SOS y POP).

Imagen 10. CBE preparado de acuerdo con la presente patente, se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento



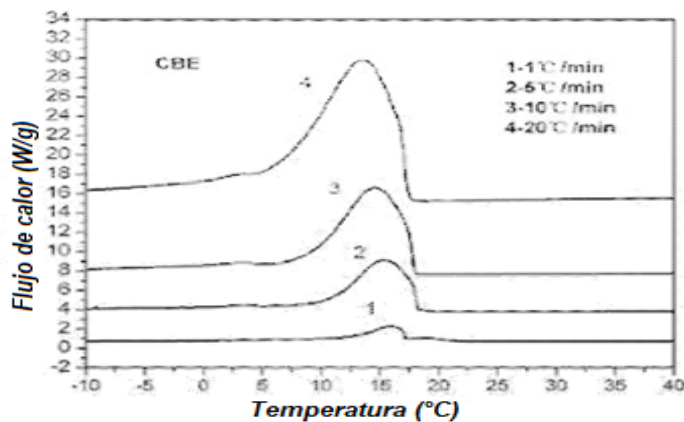
Fuente: Method for continuously preparing cocoa butter equivalent. De los autores WENG XINCHU; WANG SHENGJIE; Z HUO ZHIYANG.

2.1.2.4 Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterification. WENG XINCHU; LI CHENG; SONG NING. La patente describe un método para la preparación de un equivalente a la manteca de cacao por medio de transesterificación enzimática usando un extracto de fracción media de palma con ácido esteárico. El extracto de fracción media de palma con el ácido esteárico se usó en **relación desde 1:0,75 hasta 1:1,5**; respectivamente. La lipasa usada tiene las ventajas de una buena selectividad del sitio Sn-1,3; usando la lipasa (*Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei*) en la patente entre valores que oscilan entre 8 a 12% de la masa total. “La reacción se llevó a cabo a una **temperatura en un rango de 50°C a 65°C**, evitando la inhibición de la enzima; tuvo un **tiempo de reacción de 150 a 180 minutos**. Una vez terminada la reacción, se hizo un proceso de fraccionamiento con la mezcla grasa obtenida, primero se trabajó con hexano por alrededor de 6 horas a una temperatura de 0 a 4°C, terminadas el tiempo de reacción se filtró la solución, quedando dos fases de la mezcla, una sólida y una líquida; a la líquida se hizo el mismo proceso de fraccionamiento con acetona, por el mismo tiempo y la misma temperatura, estos fraccionamientos se hicieron con una relación de 10L: 1 Kg.”³⁶

³⁶ WENG XINCHU; LI CHENG; SONG NING. Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterification. 2015-04-22.

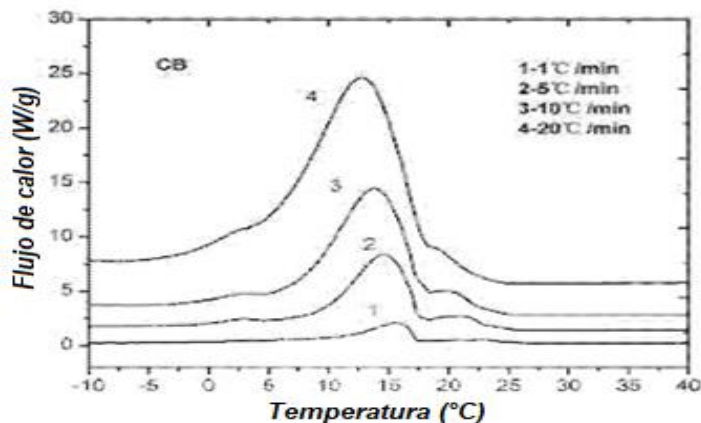
Los resultados de la patente se analizaron mediante cromatografía de gases y la curva de sólidos. Los resultados de la curva de sólidos quedan expuestos en la imagen 12 y la curva de sólidos de una manteca de cacao queda expuesta en la imagen 11, como se observa a continuación; haciendo énfasis en que la relación entre la patente y la manteca de cacao es muy similar.

Imagen 11. DSC de la manteca de cacao natural.



Fuente: Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterification. WENG XINCHU; LI CHENG; SONG NING

Imagen 12. DSC de la cristalinidad de la manteca de cacao preparada por el procedimiento de la presente invención.



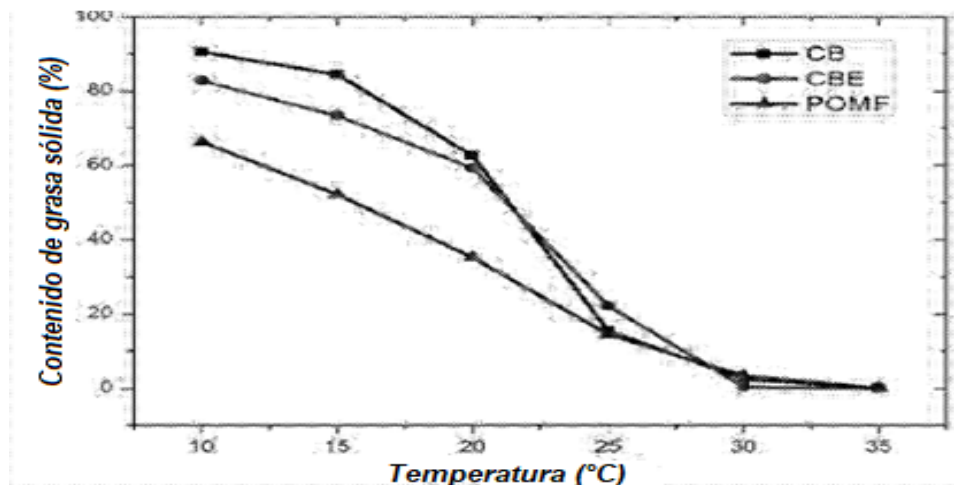
Fuente: Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterification. WENG XINCHU; LI CHENG; SONG NING

2.1.2.5 Method for preparing cocoa butter equivalent by aid of 28-degree palm oil médium fractionation substances (POMF). WENG XINCHU, WANG SHEINGJIE, ZHUO ZHIYANG. La patente describe un método para la preparación de un equivalente a la manteca de cacao mediante la ayuda de sustancias de

fraccionamiento, como primera sustancia; aceite de palma de 28 grados (POMF) con una segunda sustancia; denominado acetona, estas materias primas se usaron en **relación desde 1:4 hasta 1:6** masa-volumen respectivamente. “La mezcla se llevó a cabo a una temperatura del POMF de 28 grados con la acetona para obtener una solución mixta, una vez obtenida la solución, se llevó a una **temperatura de 40°C** disolviendo las materias primas involucradas con el fin de obtener una mezcla transparente, una vez estuvo la mezcla, se llevó a una temperatura de 9°C con el fin de cristalizar la mezcla. Se realizó la filtración a vacío sobre la solución cristalizada y se recogió la grasa sólida con una pequeña cantidad de acetona. Para liberar la grasa de la acetona, se hizo una destilación a presión reducida, de esta manera, se obtuvo la grasa sólida en una sola fase y la acetona para recuperación de la misma, logrando así el Equivalente de manteca de cacao. Se analizaron los resultados con cromatografía y con curva de sólidos y punto de fusión; de la cual, se puede observar los resultados de curva de sólidos en la imagen 13.

“El equivalente de manteca de cacao (CBE) preparado con la ayuda del método de la patente tiene características de fusión compatibles con las características de fusión de la manteca de cacao, por lo que puede añadirse una gran cantidad de equivalente de manteca de cacao a la manteca de cacao natural y el equivalente de manteca de cacao ser utilizados directamente para producir productos de chocolate diversificados (CBE).”³⁷

Imagen 13. Contenido de sólidos del equivalente de manteca de cacao (CBE), manteca de cacao (CB) y 28 gramos de extracto de aceite de palma intermedio (POMF)



Fuente: Method for preparing cocoa butter equivalent by aid of 28-degree palm oil médium fractionation substances (POMF). WENG XINCHU, WANG SHEINGJIE, ZHUO ZHIYANG.

³⁷ WENG XINCHU, WANG SHEINGJIE, ZHUO ZHIYANG. Method for preparing cocoa butter equivalent by aid of 28-degree palm oil médium fractionation substances (POMF). 2016 – 10- 26.

2.1.3 Tesis informativas para la obtención del equivalente de manteca de cacao, (CBE)

2.1.3.1 Evaluación de le enzima lipozyme tl im en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales. del autor Luis Fernando Jácome Reyes. En la investigación presente se proyectó obtener un equivalente de la manteca de cacao (CBE) mediante dos materias primas principales, las cuales eran OP/HTS (oleína de palma completamente hidrogenada) que presenta una concentración de triacilgliceridos POP y POO adecuada, ya que poseen ácido oleico en la mitad como la manteca de cacao, y ácido esteárico para que se incorpore en la posición 1 y 3 de los triacilgliceridos. Se usó una enzima 1,3 específica inmovilizada en gel de sílice (*Lipozyme TL IM*) para la reacción, la cual tuvo condiciones de **temperatura de 70°C**, agitación mecánica de 400 rpm, cantidad de enzima de 10,5% de la masa total, **relación 1:1** y **tiempo de 5 horas**. “Una vez terminada la reacción, se llevó a cabo un fraccionamiento con solventes, de la cual se obtuvo una fracción 2, con un 25% de rendimiento y concentraciones de POS y SOS cercanas a la manteca de cacao, pero POP baja; lo cual hizo que en la grasa obtenida se detectara un menor contenido de sólidos.”³⁸

En la investigación determinaron mediante el monitoreo de los principales triacilgliceridos que 2 horas de reacción es suficiente para producir las concentraciones máximas de los triacilgliceridos como POS y SOS.

2.1.3.2 Evaluación de la obtención del equivalente de manteca de cacao (cocoa butter equivalent) mediante la reacción enzimática entre oleína de palma y ácido esteárico. de los autores Cortes Suta, Carol Andrea; Rojas Corredor, Mónica Viviana. En la investigación presente se proyectó obtener un equivalente de la manteca de cacao (CBE) mediante dos materias primas principales, las cuales eran OP (oleína de palma) que presenta una concentración de triacilgliceridos POP y POO adecuada, ya que poseen ácido oleico en la mitad como la manteca de cacao, y ácido esteárico para que se incorpore en la posición 1 y 3 de los triacilgliceridos. Se usó una enzima 1,3 específica inmovilizada en gel de sílice (*Lipozyme TL IM*) para la reacción; la enzima se prepara en una solución saturada de NaCl durante 24 horas previamente a la reacción enzimática, con el fin de lograr una mayor activación de esta. La reacción tuvo condiciones de **temperatura de 60°C**, agitación mecánica de 160 rpm, cantidad de enzima de 10% de la masa total, **relación 1:2** (OP: AEPM) el ácido esteárico de pureza media presentó un perfil de ácidos grasos de 45,99% palmítico -52,85% esteárico y **tiempo de 3 horas**. Condiciones que fueron obtenidas de un artículo guía que

³⁸ JÁCOME REYES, Luis Fernando. Evaluación de la enzima Lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales. Bucaramanga, 2004. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. p. 30-32.

usaron durante todo el proyecto investigativo del Autor Ibrahim Mohamed. «Lipase-Catalyzed Synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and Saturated Fatty Acid Distillate from Palm Oil Physical Refinery».

“La fracción obtenida presentó una curva de contenido de grasa sólida con un comportamiento cercano a la MC, pero con una composición de ácidos grasos característicos diferente respecto a esta.”³⁹

2.1.3.3 Obtención de lípidos estructurados a escala semi-industrial mediante transesterificación con lipasa estereoespecíficas inmovilizadas. Del autor Safra Moreno, Nelson. En esta investigación se sintetizaron lípidos estructurados, que son triacilglicéridos modificados por la alteración de su composición de ácidos grasos y su distribución en moléculas de glicerol, por medio de transesterificación enzimática de mezclas binarias de aceite de palmiste y aceite de soya en un primer caso, en el otro caso; aceite de soya y superestearina de palma, utilizando como catalizadores lipasas (Lipozyme RM IM; Lipozyme TL IM) en **relación 1:2** de materias primas. “En el primer caso se produjo una mezcla de TAG cuya característica principal era contener ácidos grasos de cadena media en las posiciones primarias del glicerol, en el segundo caso una grasa con triacilglicerol que contienen ácido palmítico en la posición central del glicerol y ácidos grasos en las posiciones primarias.”⁴⁰

“Las mejores reacciones se determinaron haciendo uso de un diseño experimental y dos reactores; uno de tanque agitado y otro de lecho empacado; La productividad alcanzada por la primera lipasa fue de 2344 Kg de aceite por Kg de enzima, mientras que con la segunda lipasa (Lipozyme TL-IM) fue de 4281 Kg de aceite por kilogramo de enzima.”⁴¹ Siendo esta última lipasa la más efectiva en uso de mezcla de grasas.

La tabla 8 muestra el resumen de las variables del proceso para la obtención del CBE (Relación p/p, Temperatura, Cantidad de enzima, Agitación y tiempo de reacción) encontradas en la literatura descrita anteriormente.

³⁹ Cortes Carol y Rojas Mónica, Evaluación de la obtención del equivalente de manteca de cacao (Cocoa Butter Equivalent) mediante la reacción enzimática entre oleína de palma y ácido esteárico. Bogotá: Universidad de América. 2016.

⁴⁰ Safra Moreno, Nelson. OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS A ESCALA SEMIINDUSTRIAL MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASA ESTEREOESPECÍFICAS INMOVILIZADAS. Bucaramanga, 2008. Trabajo de grado (Doctor Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química

⁴¹ Safra Moreno, Nelson. OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS A ESCALA SEMIINDUSTRIAL MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASA ESTEREOESPECÍFICAS INMOVILIZADAS. Bucaramanga, 2008. Trabajo de grado (Doctor Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química (1)

Tabla 8. Resumen de las variables del proceso para la obtención de CBE encontradas en la revisión bibliográfica realizada.

Numeral	Materias primas.	Relación	Agitación	Temperatura.	Enzima	Tiempo
2.1.1.1	Oleína de palma y ácido esteárico (57%)	1:2p/p	160 RPM	60°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei</i>	3 horas.
2.1.1.2	Oleína de palma y ácido esteárico (57%)	1:3p/p	160 RPM	60°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei</i>	3 horas.
2.1.1.3	Oleína de palma y ácido esteárico (98%)	1:0,7p/p	---	70°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei</i>	12 horas
2.1.1.4	Oleína de palma y ácido esteárico (98,3%)	1:0,5p/p	200 RPM	60°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	20 horas
2.1.1.5	Oleína de palma y ácido esteárico (99%)	1:6 p/p	---	65°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	12 horas
2.1.1.6	Oleína de palma y mezcla de estearato con palmitato de etilo	2:3 mol/mol	---	60°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	30 minutos.
2.1.1.7	Oleína de palma y aceite de soja.	2:1; 1,5:1; 1:1; 1:2; 1:1,5. p/p	200 RPM	68°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	4 horas
2.1.2.1	aceite de palma 33-DEG y Ácido esteárico	1:1,9 a 1:2,2	---	50°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	150 minutos
2.1.2.2	aceite de Nuez de mango, aceite de palma	7:3 p/p	---	45°C	Solvente metilpentano	4 horas
2.1.2.3	Oleína de palma con estearato de metilo	1:1 a 1,2:1.	---	55°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	40 minutos
2.1.2.4	Oleína de palma y ácido esteárico (99%).	1:0,75 a 1:1,5	---	50°C – 65°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei</i>	150- 180 minutos.
2.1.2.5	aceite de palma de 28 grados con acetona,	1:4 a 1:6 m/v	---	40°C	---	---
2.1.3.1	Oleína de palma y ácido esteárico (99%)	1:1	400RPM	70°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	5 horas
2.1.3.2	Oleína de palma y ácido esteárico (99%) .	1:3	160RPM	60°C	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	3 horas
2.1.3.3	aceite de soja y superestearina de palma	1:2	---	---	<i>Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei.</i>	---

La búsqueda bibliográfica descrita anteriormente indica las variables adecuadas para trabajar un proceso de reacción enzimática, los datos expuestos en la tabla 8 están directamente relacionados con las variables seleccionadas para la realización de los ensayos preliminares. Al hacer un análisis minucioso de los resultados logrados en investigaciones anteriores basados en proyectos de CBE, se obtienen ciertos rangos de las variables con mejores resultados para el desarrollo del producto. De todas las investigaciones consultadas se tomaron cinco variables para el desarrollo de este proyecto: la relación de materias primas, específicamente Ácido Esteárico y Oleína de palma entre valores de 1:1 a 1:3, el rango de temperatura oscila entre 60°C a 70°C, el tiempo de reacción entre 3 y 5 horas, la cantidad de enzima de 8% a 10% de la masa total de sustratos y una agitación de 400 RPM.

Teniendo en cuenta los rangos estipulados anteriormente se realizan tres ensayos preliminares con el fin de conocer el comportamiento de las variables durante la reacción enzimática.

2.2 ENSAYOS PRELIMINARES

Basados en la revisión bibliográfica (Tesis de grado, artículos y patentes) descrita en el numeral 2.1 y gracias a los rangos obtenidos de cada una de las variables (Relación, Temperatura, Tiempo de reacción, agitación y cantidad de enzima) se decide realizar 3 ensayos preliminares con el fin de determinar si las variables encontradas en la literatura para el proceso de obtención de CBE influyen de forma positiva en el sistema con el cual se va a trabajar en la empresa SIGRA S.A, a fin de que los resultados obtenidos sean semejantes a los descritos en la revisión bibliográfica.

El primer ensayo preliminar se efectúa con una relación 1:3, temperatura de 60°C y tiempo de 4 horas; el segundo ensayo se realiza con una relación 1:2, temperatura de 60°C, tiempo de 4 horas y el tercer ensayo preliminar con una relación 1:2, temperatura de 60°C y un tiempo de 6 horas. Con el desarrollo de dichos ensayos preliminares se quiere conocer el comportamiento de las variables designadas durante la reacción enzimática.

2.2.1 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS

Para llevar a cabo la reacción de interesterificación, se deben conocer previamente algunas características físicas y químicas de cada materia prima, con el fin de que estas puedan afectar la reacción en forma directa impidiendo la formación de los TAG's de interés, por lo tanto, se tienen en cuenta sus fichas técnicas (**Ver ANEXO A**).

2.2.1.1 Oleína de palma. La oleína de palma es otorgada por la empresa SIGRA S.A, esta presenta un color amarillo claro el cual es translúcido a temperatura ambiente, es inodora y viscosa además es muy resistente a la oxidación, la oleína debe cumplir con los procedimientos descritos en las normas del Instituto colombiano de normas técnicas y certificación (ICONTEC): NTC 213 (2013) "Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación de punto de fusión (punto

de deslizamiento)⁴²; NTC 283 (2012) “Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación de índice de yodo⁴³ y NTC 218(2012) “Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de acidez y acidez⁴⁴”; esto con el fin de obtener las características específicas de una oleína de palma las cuales la diferencian de otros aceites y grasas.

Imagen 14. Oleína de palma



2.2.1.2 Palma totalmente hidrogenada. La palma totalmente hidrogenada es otorgada por la empresa SIGRA S.A, la cual al pasar por el proceso de hidrogenación no presenta enlaces insaturados en su estructura, tiene una textura semi-sólida a temperatura ambiente, así como un color amarillo claro, algunas de sus propiedades son: Punto de fusión de 56-58°C el cual se determina con el procedimiento descrito en la norma NTC 213 (2013), Índice de yodo (Máximo de 1) basado en el procedimiento que proporciona la norma NTC 283 (2012), así como un contenido de grasa sólida (%FFA) de 0,06% y una humedad (Máximo de 0,05).

Imagen 15. Oleína de palma totalmente hidrogenada



⁴² ICONTEC. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación de punto de fusión (punto de deslizamiento). [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC213.pdf>

⁴³ ICONTEC. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de yodo. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://documents.tips/documents/ntc-283.html>

⁴⁴ ICONTEC. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de acidez y acidez. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 292017]. disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/37847405/norma-tecnica-ntc-colombiana-218>

2.2.1.3 Ácido esteárico. Este compuesto se adquiere del distribuidor Legaquímicos-Materias primas y se clasifica según su pureza “PUREZA BAJA” (presentación esférica y de color blanco) y la razón por la cual se selecciona este ácido esteárico es porque en la tesis “Evaluación de la obtención del equivalente de manteca de cacao (cocoa butter equivalent) mediante la reacción enzimática entre oleína de palma y ácido esteárico” descrita en el numeral 2.1.3.2 se obtienen buenos resultados con respecto al contenido de grasa sólida de una manteca de cacao de referencia, sin embargo al realizar el análisis de cromatografía de gases basado en la norma NTC 4967 (Según norma interna de Sigrá S.A) (**Ver ANEXO B**) se obtiene que el perfil de ácidos grasos de este ácido es (67% palmítico-33% esteárico).

Imagen 16.Ácido esteárico “Pureza Baja”



2.2.1.4 Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei”. se escogió esta enzima ya que es la más empleada y estudiada para el proceso de obtención del CBE; es utilizada como catalizador en la reacción de interesterificación ya que al ser una lipasa 1-3 específica va a romper la cadena de los triglicéridos presentes en la mezcla grasa en las posiciones 1 y 3 con el fin de obtener los TAG de interés, además de esto no debe sobrepasar una temperatura de 70°C ya que se presentaría su inactivación en el medio de reacción. Esta lipasa al ser inmovilizada presenta algunas ventajas como son: la recuperación de la enzima del medio de reacción y la obtención de un producto que no se contamina con la presencia de la enzima y el incremento en la estabilidad de la lipasa⁴⁵. Su presentación viene en forma granular, es de color marrón claro, debe almacenarse a una temperatura de (2-8°C) y mantenerse seco y alejado de la luz solar. La enzima se emplea tal y como viene en el empaque sin hacerle ningún proceso para su activación.

⁴⁵ GONZÁLEZ, Jorge; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Jairo y DEL MONTE MARTÍNEZ, Alberto Las lipasas enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15574/38075>

Imagen 17. Enzima Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei.



2.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

Cuadro 1. Equipos e Instrumentos

Nombre	Descripción
<p data-bbox="428 909 781 940">Baño con recirculación</p> 	<p data-bbox="899 909 1300 940">SOXTEC SYSTEM HT 1046</p> <p data-bbox="899 947 1438 1178">Viene con una capacidad por lote: 2 muestras, su medio de calentamiento es por placas en la unidad de extracción, con una precisión T: ± 2 °C y un rango de temperaturas: de 20 a 200 °C.</p>
<p data-bbox="545 1318 667 1350">Reactor</p> 	<p data-bbox="899 1318 1325 1350">Reactor vidriado NOC LTDA</p> <p data-bbox="899 1356 1438 1650">Es un reactor enchaquetado el cual tiene una capacidad máxima de 500 mL, su material es soplado de vidrio y consta de : un filtro de vidrio poroso, una abrazadera y la tapa del reactor las cual tiene tres orificios para agregar los compuestos a reaccionar.</p>

Cuadro 1. (Continuación)

Nombre	Descripción
<p data-bbox="446 317 763 352">Motor para agitación</p> 	<p data-bbox="1024 352 1328 422">FISHER SCIENTIFIC steadfast Overhead</p> <p data-bbox="899 428 1438 642">Consta con una velocidad máxima de 1200 rpm, una potencia de 1/8 HP, su volumen máximo es 30 L, Máxima Viscosidad: 15000 cpc, tiene un peso de 9 Libras y un voltaje de 120 V, 60 HZ.</p> <p data-bbox="899 648 1438 789">Además, contiene un indicador que va del 0 al número 10. Para poder saber a cuantas rpm está operando el quipo</p>
<p data-bbox="480 810 727 846">Bomba de vacío</p> 	<p data-bbox="1065 810 1268 846">ROCKER 600</p> <p data-bbox="899 852 1438 1161">Es empleada para filtración al vacío. Tiene una presión máxima de vacío de 86,66 KPa, con una potencia de 190W, consta de un manómetro tipo bourdon sin glicerina, Voltaje:110V, peso neto de 7,6 Kg, dimensiones: (LxAxA) 34,1cm x 17,6 cm x 19,4 cm y nivel de ruido 62dB⁴⁶</p>
<p data-bbox="404 1215 802 1251">Balanza de precisión Kern</p> 	<p data-bbox="1070 1215 1263 1251">EWB 620-2M</p> <p data-bbox="899 1257 1438 1440">Consta con una capacidad máxima: 620 g, una capacidad mínima: 0.5 g, Lectura: 0.01 g y Precisión: ± 0.01 g. Dimensiones de la carcasa: (AxPxA) 182 mm x 235 mm x 75 mm⁴⁷</p>

⁴⁶ ROCKER SCIENTIFIC CO, Ltd. Rocker 600. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.rocker.com.tw/product-3.asp?ser=111>

⁴⁷ SERVIBALANZAS. Balanza de precisión marca KERN de Alemania modelo EWB-620-2M. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.servibalanzas.com/index.php/productos/balanzas/balanza-de-precision-marca-kern-de-alemania-modelo-ewb-620-2m-detail>

Cuadro 1. (continuación)



Nombre	Descripción
<p style="text-align: center;">Analizador “Minispec”</p> 	<p style="text-align: center;">Equipo RMN MQ- ONE SFC</p> <p>Este equipo sirve para determinar el contenido de grasa sólida (SFC), incluye varios métodos como directos, en serie, paralelos indirectos. Las muestras de mezclas grasas u otras materias primas que se usan en este equipo deben caracterizarse y controlarse de acuerdo a sus perfiles de fusión⁴⁸ (según norma interna de SIGRA S.A)</p>
<p style="text-align: center;">Cromatógrafo de gases</p> 	<p>Este equipo proporciona el perfil de triglicéridos de una mezcla grasa. la columna maneja una temperatura de 175°C; el inyector trabaja con una temperatura de 350°C y Horno FID (detector) trabaja a una temperatura de 390°C, La presión del cromatógrafo es de 5psi, además los flujos de aire e hidrogeno deben estar en 300mL/min y 20 -30 mL/min respectivamente, además el tamaño de la columna es: 28 cm (w) x 19 cm (d) x 28 cm (h) ⁴⁹</p>
<p style="text-align: center;">Embudo</p> 	<p style="text-align: center;">Tipo Büchner</p> <p>Es un embudo especial fabricado en porcelana el cual es utilizado para la filtración al vacío, consta de una placa circular que posee perforación y está ubicada en la zona superior cilíndrica. Cuando se conecta tiene alrededor de 15 libras por inch² empujando hacia abajo de él.⁵⁰</p>

⁴⁸ JENCK S.A. Resonancia Magnética Nuclear de Dominio Temporal. Bruker. Minispec mq-one-SFC. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://www.jenck.com/productos/producto/minispec-mq-one-sfc>

⁴⁹ Varian INC. CP-3800 GC Getting Started Manual. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Varian2200/914647.pdf>

⁵⁰ TP-LABORATORIO QUÍMICO. Embudo Büchner. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-buchner.html>

Cuadro 1. (Continuación)

Nombre	Descripción
<p data-bbox="440 327 748 359" style="text-align: center;">Erlenmeyer de vacío</p> 	<p data-bbox="954 327 1382 359" style="text-align: center;">Oliva de vidrio lateral-Duran</p> <p data-bbox="889 365 1448 615">Fabricado en vidrio borosilicato; debido al gran espesor de su pared este frasco es resistente al vacío. Consta de una altura de 155mm, con diámetro base de 85mm, diámetro de la boca de 34 mm y con un diámetro de la oliva de 11mm. Capacidad: 250mL⁵¹</p>
<p data-bbox="508 659 678 690" style="text-align: center;">Papel filtro.</p> 	<p data-bbox="1024 659 1312 690" style="text-align: center;">Munktell grade 388</p> <p data-bbox="889 730 1448 995">Se utilizan para la filtración Büchner pues la superficie dura y lisa del filtro hacen que sea fácil la recuperación del precipitado. Consta de un Peso base: 84 g/m², una Velocidad filtración: 10 s/10mL y una Retención típica: 12-15 micrómetros.⁵²</p>

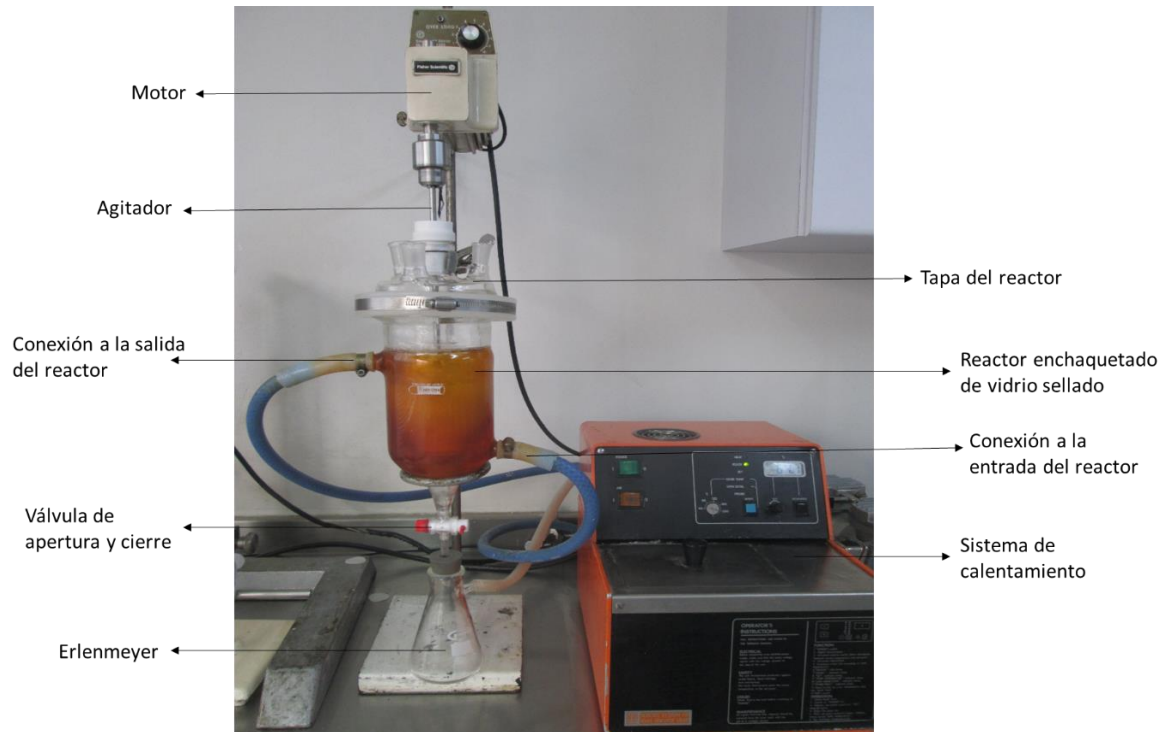
2.2.3 Montaje del reactor para realizar la reacción de interesterificación. Para llevar a cabo la reacción de interesterificación se requieren varios equipos (Reactor, motor Fisher Scientific con agitador, la unidad de sistema de calentamiento por medio de aceite y una bomba para hacer vacío), los cuales deben ser ensamblados de la siguiente manera como se aprecia en la imagen 18: El reactor en su interior tiene un filtro de vidrio poroso, además de esto cuenta con una tapa, una abrazadera, una válvula de apertura y cierre con selladores en silicona con el fin de impedir o dejar salir la mezcla que se introduzca en el reactor. Inicialmente se debe ensamblar la tapa del reactor al agitador el cual debe acoplarse al motor Fisher Scientific con el fin de saber la velocidad de agitación; una vez se tenga esta parte se procede a ensamblar el reactor a la tapa del mismo con la ayuda de la abrazadera y verificando siempre que este acoplamiento quede alineado. Como el reactor es enchaquetado de vidrio sellado tiene una entrada (extremo inferior) y una salida (extremo superior) a las cuales se acoplan las dos conexiones que tiene la unidad de sistema de calentamiento de recirculación de

⁵¹LABBRANDS. Erlenmeyer para vacío (Kitasoto) oliva vidrio-Duran. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: http://www.labbrands.com/erlenmeyer-vacio-vidrio/64-erlenmeyer-para-vacio-kitasoto-oliva-vidrio-en-vidrio-duran.html#data_sheet

⁵² MUNKTELL AHLSTROM. Laboratory Filtration Catalog. (Pág. 4). [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.centerquimica.com.ar/productos/ahlstrom-european-lab-catalog-august-2015.pdf>

aceite permitiendo que el líquido fluya esta zona del reactor con el fin de mantener la temperatura que se desee en la experimentación de una forma estable.

Imagen 18. Montaje para realizar la reacción de interesterificación



Una vez que termina la reacción de interesterificación enzimática, se abre la válvula que tiene el reactor y cuando la mezcla grasa es retirada del mismo; se debe ensamblar un erlenmeyer con oliva lateral a la parte inferior del reactor, la conexión auxiliar que tiene la bomba de vacío debe ir ensamblada a la oliva lateral del erlenmeyer, esto, con el fin de generar vacío y extraer la grasa que pueda quedar atrapada en la enzima.

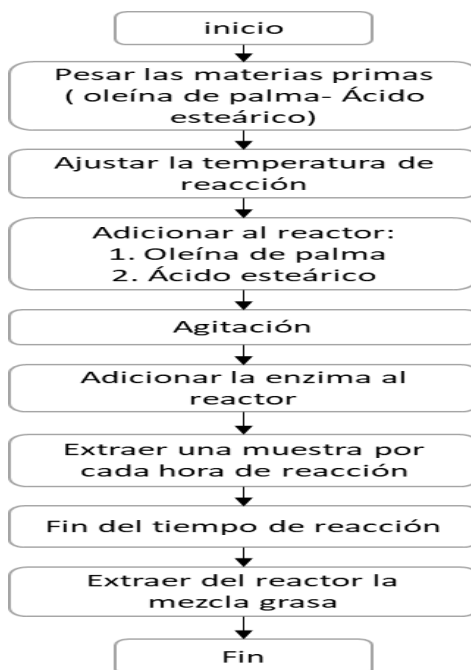
La reacción de interesterificación enzimática se lleva a cabo a nivel laboratorio en un reactor enchaquetado de vidrio con una capacidad máxima de (500mL) de la cual se utiliza el 84 % de su capacidad, esto con el fin de no sobresaturar el reactor además de la recomendación del ingeniero a cargo. se deben pesar las materias primas en determinadas relaciones p/p y utilizar como catalizador Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei en cierto porcentaje (basado en el peso de los sustratos)⁵³.

Como se muestra en el diagrama 3 el procedimiento a seguir es el siguiente: Inicialmente se deben pesar las materias primas con el fin de adicionarlas al

⁵³ IBRAHIM O. MOHAMED. Lipase-Catalyzed Synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and Saturated Fatty Acid Distillate from Palm Oil Physical Refinery. En: Applied Biochemistry Biotechnology, (2012); Vol. 168 p. 1405–1415

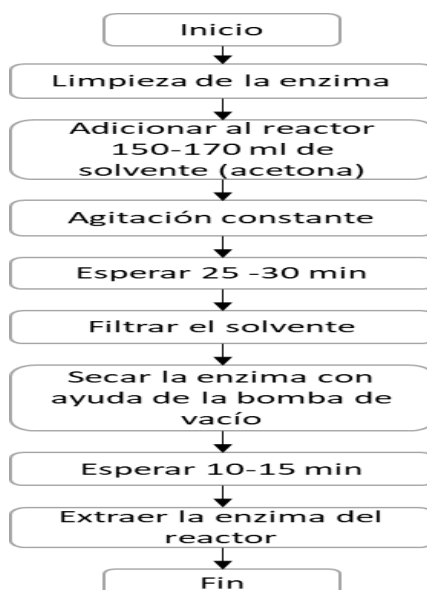
reactor una a la vez; preferiblemente la que se encuentre en estado líquido debe ir primero y posterior a esto el compuesto en estado sólido, la mezcla se calienta por medio de la unidad de servicio de recirculación de aceite a la temperatura deseada para cada uno de los experimentos y con la ayuda del agitador presente en el motor Fisher Scientific se logra la homogeneización de la mezcla grasa, a continuación se adiciona la cantidad de enzima requerida (porcentaje con respecto al peso de los sustratos), esta no requiere ningún proceso previo para su activación. Una vez estipulado el tiempo de reacción se extraerá una muestra cada hora hasta culminar la experimentación con el fin de llevar las muestras a sus respectivos análisis (Perfil de Triglicéridos). Cuando finaliza el tiempo de reacción se debe extraer del reactor la mezcla grasa obtenida en cada experimentación.

Diagrama 3. Procedimiento para llevar a cabo la reacción enzimática



Al finalizar la reacción de interesterificación, se debe limpiar la enzima con 150-170 mL de solvente (acetona) los cuales se adicionan al reactor y con la ayuda del motor se obtiene una agitación constante, este proceso debe durar entre 25-30 min (Según norma interna de Sigra S.A), posterior a este proceso se debe hacer la filtración del solvente y el secado de la enzima con la ayuda de la bomba de vacío por un tiempo de 10-15 min (según norma interna de Sigra S.A) con el fin de obtener una enzima sin residuos grasos y de aspecto granular similar a su presentación original. El proceso se describe en el diagrama 4.

Diagrama 4. Procedimiento para la limpieza de la enzima.



2.2.4 Descripción de procedimiento Ensayos preliminares. En los tres ensayos preliminares efectuados se seleccionaron las materias primas a utilizar en cada experimento (se utiliza el ácido esteárico de “PUREZA BAJA”) y las condiciones de operación para la reacción (Relación p/p, temperatura, agitación, cantidad de enzima y tiempo de reacción). En la tabla 9 se hace una descripción de las variables seleccionadas y explicadas anteriormente.

Esta experimentación se realiza con el fin de obtener información pertinente sobre el perfil de triglicéridos de la mezcla grasa que reacciona y así analizar el comportamiento de las variables que influyen en el proceso de producción del CBE con el fin de establecer un diseño de experimentos en el siguiente capítulo.

Tabla 9. Descripción de las variables utilizadas en la elaboración de ensayos preliminares para obtención de CBE’s.

Ensayo	Materia Prima	Relación (p/p)	Temperatura (°C)	Tiempo Reacción (h)	%Enzima	Agitación (RPM)
1	PO _r -PO ₅₈	1:3	60	4	10%	400
2	PO _r -Ácido esteárico (AEPB)	1:2	60	4	10%	400
3	PO _r .Ácido esteárico (AEPB)	1:2	60	6	8%	400

AEPB: Ácido esteárico “PUREZA BAJA”.

2.2.4.1 Primer ensayo Preliminar. En este ensayo se utilizan como materias primas la oleína de palma (PO_f) y la palma totalmente hidrogenada (PO_{58}) esta última se escoge debido a que su perfil de ácidos grasos libres es similar en cuanto a la composición de un ácido esteárico comercial (58% palmítico- 42% esteárico) por lo cual se optó por asociar estas dos grasas con el propósito de realizar la reacción de interesterificación enzimática a fin de obtener resultados que puedan ser cercanos al producto deseado (CBE). Por ello se deben ajustar las condiciones de operación a nivel laboratorio (tiempo de reacción, cantidad de enzima, relación p/p entre las materias primas y Temperatura), para saber que modificaciones se deben realizar en los otros ensayos.

Primero se deben hacer los cálculos para determinar la cantidad de materia prima; Las materias primas utilizadas en esta experimentación constan de una relación 1:3 p/p. Para poder calcular la cantidad de cada una de las materias primas se deben tener en cuenta la densidad de la oleína de palma (0,7g/ml) y un volumen del reactor utilizado (84% de su capacidad) lo cual son 420 mL con el fin de obtener la cantidad de masa total requerida en el reactor.

$$\rho = \frac{m_T}{V} \rightarrow m_T = \rho * V$$

Donde:

ρ =densidad oleína de palma (0,7g/mL)

V = Volumen del reactor 420 mL (84% capacidad)

$$m = 0,7 \frac{g}{mL} * 420mL$$

$$m_T = 294 \text{ gramos (Masa Total)}$$

Teniendo en cuenta que la relación p/p entre las materias primas utilizadas es 1:3 entonces:

$$masa_{total} = oleina \text{ de palma } (PO_f) + oleina \text{ totalmente higrrogenada } (PO_{58})$$

$$294 \text{ gramos} = (1)X + (3)X$$

$$294 \text{ gramos} = (4)X$$

$$X = \frac{294 \text{ gramos}}{4} \rightarrow X = 73,5 \text{ gramos (oleina de palma)}$$

Para la Palma totalmente hidrogenada será:

$$PO_{58} = 3X \rightarrow 3(73,5\text{gramos})$$

$$PO_{58} = 220,5 \text{ gramos (oleina totalmente hidrogenada)}$$

Cantidad de enzima:

Sabiendo que la cantidad de enzima a usar tiene una proporción de 10% del peso de los sustratos (masa total), entonces:

$$\text{Cantidad de enzima} = 10\% * \text{Masa Total}$$

$$\text{Cantidad de enzima} = 0,1 * 294 \text{ gramos} \rightarrow 29,4 \text{ gramos de enzima}$$

Estos cálculos son los valores teóricos, pero al hacer la experimentación estos datos varían un poco al ser pesados en la balanza analítica. En la tabla 10 se presentan las especificaciones de las condiciones de operación utilizadas en esta experimentación.

Tabla 10. Condiciones de operación del primer ensayo preliminar

Relación	1:3
Peso PO _f	220,5g
Peso PO ₅₈	73,5g
Peso Lipozyme IM.	29,3g
Tiempo	4 h
Temperatura	60°C
Agitación	400 RPM

Posterior al pesaje de las materias primas (oleína de palma - Palma totalmente hidrogenada) a utilizar y la cantidad de enzima, se debe efectuar el montaje para poder realizar la reacción, el cual está descrito en el numeral 2.2.3, con el fin de adicionar al reactor las materias primas; esta mezcla grasa se debe calentar a una temperatura de 66°C y con una agitación constante (400- 500 RPM) con el propósito de fundir los cristales que se encuentren presentes en la mezcla grasa y cuando esta se vea totalmente homogénea se debe ajustar la temperatura a 60°C la cual es la seleccionada para esta reacción; a continuación se adiciona la cantidad de enzima descrita en la tabla 10 y así comienza la reacción de interesterificación enzimática la cual tiene una duración de 4 horas, en las que se va a tomar una muestra de la mezcla grasa cada hora y a cada una de las materias primas con el fin de llevarlas al análisis de cromatografía de gases y así obtener el perfil de TAG's presentes en la mezcla grasa.

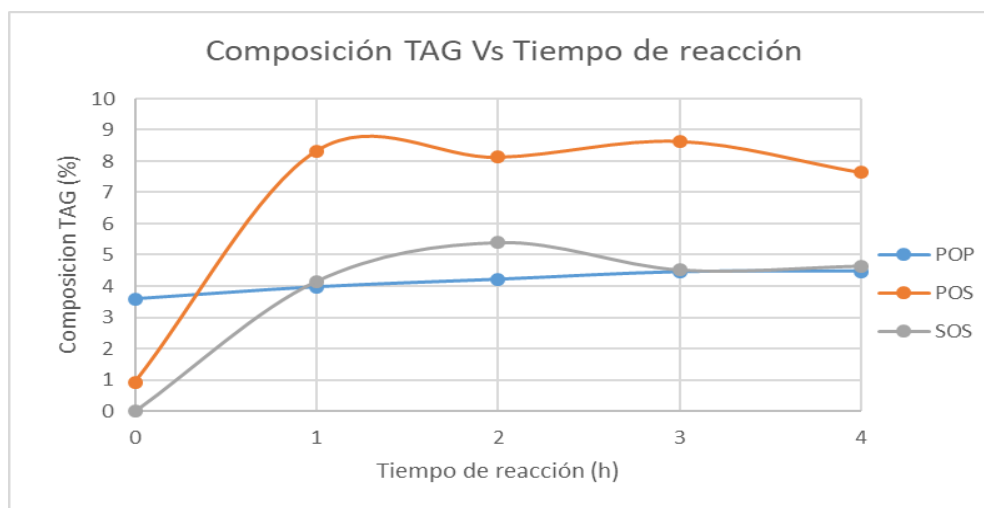
En la tabla 11 se hace una descripción de las muestras que se tomaron durante la experimentación y a las cuales se les realiza el análisis de cromatografía para obtener su perfil de triglicéridos (**Ver ANEXO D**), con el fin de llevar a cabo el respectivo análisis de estos resultados.

Tabla 11. Muestras obtenidas en el primer ensayo preliminar.

Muestras	Descripción
M1	Muestra de PO _F (sola)
M2	Muestra de PO ₅₈ (solo)
M3	Mezcla PO _F Y PO ₅₈ en el tiempo cero
M4	Mezcla PO _F Y PO ₅₈ . Tiempo 1 hora
M5	Mezcla PO _F Y PO ₅₈ . Tiempo 2 horas
M6	Mezcla PO _F Y PO ₅₈ . Tiempo 3 horas
M7	Mezcla PO _F Y PO ₅₈ . Tiempo 4 horas
M8	FRACCIONAMIENTO Muestra fase sólida 1 (después de adicionar el solvente(Hexano) con una temperatura de 25°C
M9	Muestra fase líquida (después de adicionar la relación 1:5 con el solvente (Hexano) con una temperatura de 4°C
M10	Muestra fase sólida 2 (después de adicionar la relación 1:5 con el solvente (Hexano)

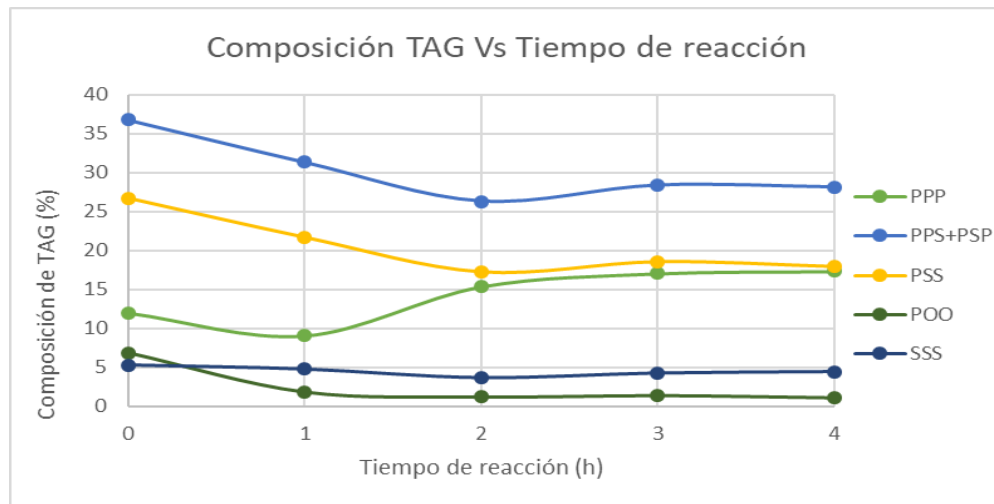
2.2.4.1.1 Análisis de resultados del ensayo preliminar 1. Con los porcentajes de triglicéridos obtenidos en el análisis de cromatografía se realizan dos gráficas, en la primera de ellas se encuentran los tres TAG's de interés (POP, POS y SOS) y se muestra el comportamiento de estos con respecto al tiempo de reacción y en la segunda gráfica se destacan algunos triglicéridos presentes en la mezcla grasa y que tienen composiciones altas a medida que transcurre la reacción de interesterificación enzimática.

Gráfica 1. Triglicéridos de interés Vs Tiempo de reacción. Primer ensayo preliminar



En la gráfica 1 se puede evidenciar que los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) no aumentan su composición significativamente a medida que transcurre el tiempo de reacción pues el POP aumenta un 0,88% el POS un 6,72% y el SOS aumenta un 4,64% , esto se debe a que la composición inicial de la mezcla grasa no tiene gran cantidad de ácido oleico en la posición sn-2 de las cadenas de los triglicéridos que están presentes en la mezcla porque la oleína de palma totalmente hidrogenada no cuenta en su composición con este ácido y como el único aporte de ácido oleico lo genera la oleína de palma (gracias al triglicérido POO) este no es suficiente pues la relación peso /peso de la palma totalmente hidrogenada es tres veces mayor a la de la oleína de palma ,lo cual impide que el reordenamiento que genera la reacción de interesterificación enzimática en las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos favorezca a los TAG´s de interés.

Gráfica 2. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs Tiempo de reacción. Primer ensayo preliminar



Además de esto en la gráfica 2 sobresalen diferentes triglicéridos obtenidos en la mezcla grasa debido a su comportamiento en la reacción, como lo es el TAG PPP el cual aumenta un 5,31% su composición a medida que transcurre el tiempo de reacción, esto implica que la composición de los TAG´S de interés no aumente porque este triglicérido está siendo favorecido con los ácidos palmíticos que pueden salir de las posiciones 1 y 3 del TAG PPS+PSP pues se ve claramente que en las cuatro horas de reacción la composición del TAG anteriormente mencionado disminuye un 8,64% lo cual confirma que el ácido palmítico tiene más afinidad con otros triglicéridos diferentes a los de interés.

En conclusión, la mezcla de oleína de palma(PO_f) y la palma totalmente hidrogenada(PO_{58}) no es la indicada para obtener un equivalente a la manteca de cacao (CBE) porque como se muestra en la gráfica 1 la composición de los triglicéridos de interés no es semejante a los de una manteca de cacao en todo el tiempo de reacción, con lo cual se debe cambiar la oleína totalmente hidrogenada preferiblemente por un ácido graso libre como el ácido esteárico y/o palmítico.

2.2.4.2 Segundo ensayo Preliminar. En este ensayo se utilizan como materias primas la oleína de palma (PO_r) y ácido esteárico comercial (“PUREZA BAJA”), se ajustan las condiciones de operación a nivel laboratorio (tiempo de reacción: 4 horas, cantidad de enzima: 10% de la masa total, relación: 1:2 p/p entre las materias primas y Temperatura: 60°C) como se muestra en la tabla 12 .La información con la que se sacaron los datos anteriormente expuestos se basaron en la literatura, específicamente en el artículo “Lipase-catalyzed Synthesis of cocoa butter equivalent from palm olein and saturated fatty acid distillate from palm oil physical refinery”⁵⁴

Primero se efectúan los cálculos para conocer la cantidad de cada materia prima, el procedimiento de cálculos es el mismo que esta descrito en el numeral 2.3.2.1, variando la relación ya que en esta experimentación es R 1:2 p/p. en la tabla 12 se encuentran descritas las condiciones de operación para realizar la reacción de interesterificación en este experimento.

Tabla 12. Condiciones de operación del segundo ensayo preliminar

Relación	1:2
Peso PO _r	98 g
Peso Ácido esteárico	196g
Peso Lipozyme IM.	29,3g
Tiempo	4 h
Temperatura	60°C
Agitación	400 RPM

Una vez se realiza el pesaje de las materias primas (oleína de palma – ácido esteárico) y la cantidad de enzima, se lleva a cabo el montaje del reactor el cual está descrito en el numeral 2.4.1, con el fin de empezar la reacción de interesterificación enzimática la cual tiene una duración de 4 horas, en las que se va a tomar una muestra de la mezcla grasa cada hora con el fin de obtener el perfil de triglicéridos presente en cada muestra gracias al análisis de cromatografía de gases.

En la tabla 13 se hace una descripción de las muestras que se tomaron durante la experimentación y a las cuales se les realiza el análisis de cromatografía para obtener su perfil de triglicéridos (**Ver ANEXO D**), con el fin de llevar a cabo el respectivo análisis de estos resultados.

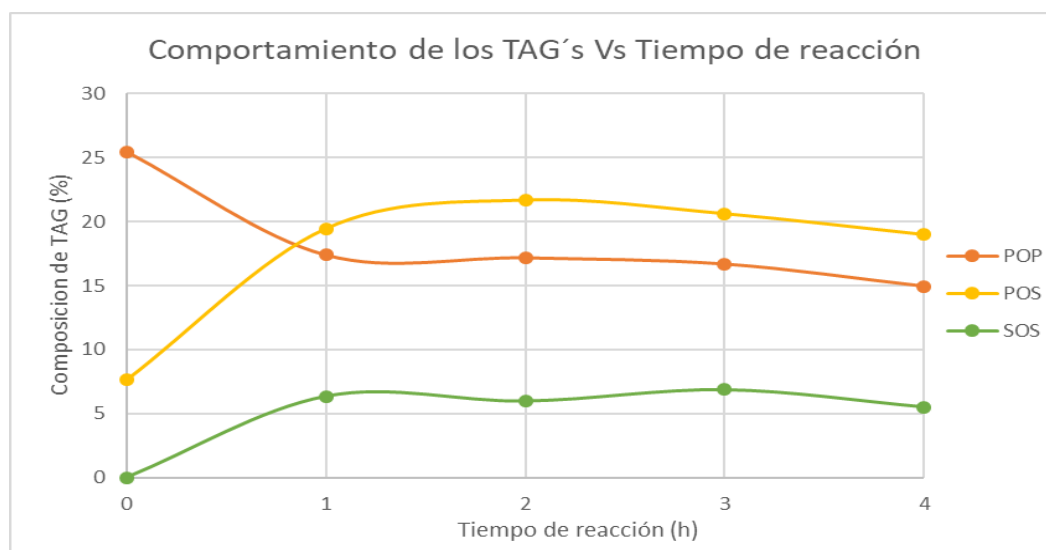
⁵⁴ IBRAHIM O. MOHAMED. “Lipase-Catalyzed Synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and Saturated Fatty Acid Distillate from Palm Oil Physical Refinery” En Applied Biochemistry Biotechnology, (2012); Vol. 168 p. 1405–1415.

Tabla 13. Muestras obtenidas en el segundo ensayo preliminar.

Muestras	Descripción
M1	Mezcla PO _f - Ácido esteárico (tiempo cero)
M2	Mezcla PO _f -Ácido esteárico (1 hora)
M3	Mezcla PO _f -Ácido esteárico (2 horas)
M4	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(3 horas)
M5	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(4 horas)
M6	FRACCIONAMIENTO 1: Muestra fase sólido 1
M7	Muestra fase líquida
M8	Muestra fase sólido 2
M9	FRACCIONAMIENTO 2: Muestra fase sólido 1
M10	Muestra fase líquida
M11	Muestra fase sólido 2

2.2.4.2.1 Análisis de resultados del segundo ensayo preliminar. El procedimiento a realizar es el mismo descrito en el numeral 2.2.4.1.1.

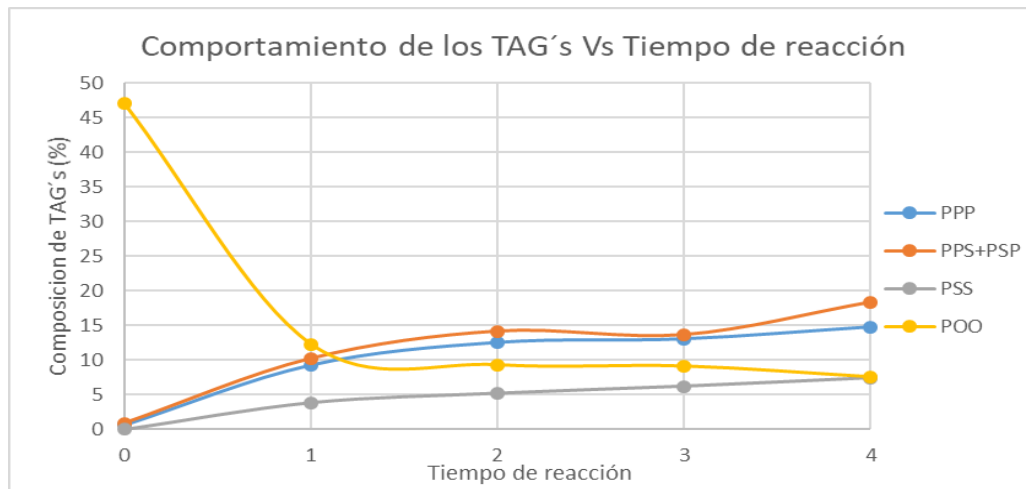
Gráfica 3. Comportamiento de los TAG's de interés con respecto al tiempo de reacción. Segundo ensayo preliminar



Se observa que el TAG POP inició la reacción con una composición de 25,47% pero a medida que transcurre el tiempo de reacción esta composición disminuye hasta 14,34% lo cual se debe a que la reacción de interesterificación reordena las posiciones 1 y 3 de este triglicérido con lo cual el ácido palmítico se desplaza hacia otros TAG's como el PPP y el PPS+PSP. El comportamiento del TAG POS

es aleatorio pues hasta la segunda hora de reacción su composición aumenta hasta 21,68% y las horas siguientes esta composición disminuye un 2,7% lo cual indica que otros triglicéridos como el PSS y el PPP están compitiendo con el TAG de interés (POS) por los ácidos palmítico y esteárico. El TAG SOS genera una composición aleatoria a medida que la reacción transcurre, esto se debe a que el ácido esteárico lo recibe de triglicéridos como el SOO y POS, pero simultáneamente compite con el TAG PSS lo cual impide que la composición del triglicérido de interés aumente significativamente.

Gráfica 4. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs tiempo de reacción. Segundo ensayo preliminar



En la gráfica 4 se observa el comportamiento de diferentes triglicéridos los cuales influyen en la composición de los triglicéridos de interés, como lo es el POO el cual tiene un comportamiento decreciente (39,57%) en cuanto a su composición, esto significa que está favoreciendo la formación de los TAG's POP y POS. En cuanto al TAG PSS su composición aumenta un 7,36% en todo el tiempo de reacción lo cual da a conocer que el ácido esteárico se dirige más hacia este triglicérido que al de interés (SOS). El PPP muestra un comportamiento creciente a lo largo del tiempo de reacción quedando con una composición final de 14,71%, ya que las materias primas utilizadas tienen una buena cantidad de ácido palmítico pues el ácido esteárico utilizado tiene un porcentaje mayor de ácido palmítico que de esteárico, por lo tanto, los triglicéridos de interés (POP y POS) se ven afectados por el TAG PPP y PPS+PSP porque tienen que competir por el ácido palmítico presente en la mezcla grasa.

Las composiciones de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) son más similares a las de una manteca de cacao por lo cual las condiciones empleadas en este ensayo preliminar se tienen en cuenta para realizar el diseño experimental en el capítulo 3.

2.2.4.3 Tercer ensayo Preliminar. En este ensayo se utilizan como materias primas la oleína de palma (PO_r) y ácido esteárico comercial de ("PUREZA BAJA"),

se ajustan las condiciones de operación a nivel laboratorio (tiempo de reacción: 6 horas, cantidad de enzima: 8% de la masa total, relación: 1:2 p/p entre las materias primas y Temperatura: 60°C). La información anterior se basa en la literatura encontrada, específicamente descrita en el numeral 2.1.3.2, variando la cantidad de enzima y el tiempo de reacción para conocer qué influencia tiene en el proceso de interesterificación enzimática.

Se deben efectuar los cálculos para conocer la cantidad de cada materia prima, el procedimiento de cálculos está descrito en el numeral 2.3.2.1; variando la relación ya que en esta experimentación es R 1:2 p/p. en la tabla 14 se encuentran descritas las condiciones de operación para realizar la reacción de interesterificación en este experimento.

Tabla 14. Condiciones de operación del tercer ensayo preliminar.

Relación	1:2
Peso PO _f	98,59 g
Peso Ácido esteárico	196g
Peso Lipozyme IM.	23,52g
Tiempo	6 h
Temperatura	60°C
Agitación	400 RPM

Una vez pesadas las materias primas y la cantidad de enzima, se debe realizar el montaje del reactor el cual está descrito en el numeral 2.4.1.

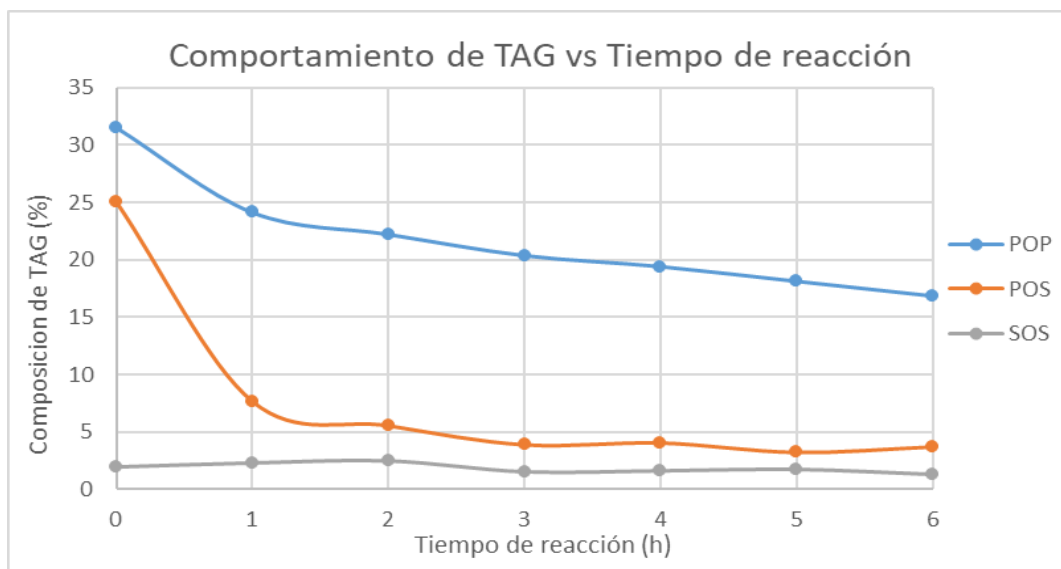
La tabla 15 presenta una descripción de las muestras que se tomaron durante la experimentación y a las cuales se les realiza el análisis de cromatografía para obtener su perfil de triglicéridos (**Ver ANEXO D**), con el fin de llevar a cabo el respectivo análisis de estos resultados.

Tabla 15. Muestras obtenidas en el tercer ensayo preliminar.

Muestras	Descripción
M1	Mezcla PO _f – Ácido esteárico (tiempo cero)
M2	Mezcla PO _f -Ácido esteárico (1 hora)
M3	Mezcla PO _f -Ácido esteárico (2 horas)
M4	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(3 horas)
M5	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(4 horas)
M6	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(5 horas)
M7	Mezcla PO _f -Ácido esteárico(6 horas)
M8	FRACCIONAMIENTO: Muestra fase sólido 1
M9	Muestra fase líquida
M10	Muestra fase sólido 2

2.2.4.3.1 Análisis de resultados del tercer ensayo preliminar. El procedimiento a realizar es el mismo descrito en el numeral 2.2.4.1.1.

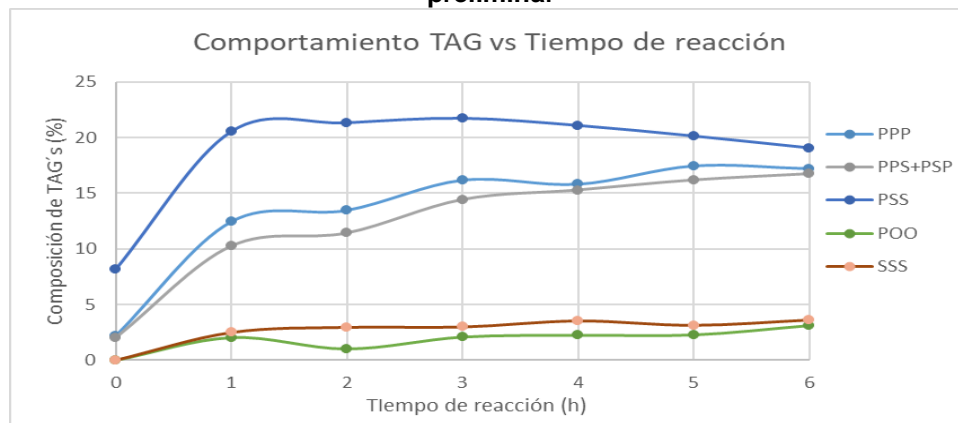
Gráfica 5. Comportamiento de los TAG's de interés con respecto al tiempo de reacción. Tercer ensayo preliminar



En la gráfica 5 se evidencia que los TAG's de interés POP y POS disminuyen significativamente su composición a lo largo de la reacción (14,79% y 21,31 % respectivamente) y el triglicérido SOS no aumenta su composición considerablemente respecto a los otros dos TAG's de interés, pues inicia con un valor de 1,98% y termina la reacción con una composición de 1,34 % lo cual deja en evidencia que el reordenamiento de los ácidos grasos (Palmítico- esteárico) generado por la reacción enzimática los desplaza a otro tipo de TAG's tales como PSS , PPP, SSS y PPS+PSP, indicando que los ácidos grasos tienen más afinidad hacia los triglicéridos mencionados anteriormente y no a las TAG's de interés.

Este comportamiento también se debe a la cantidad de enzima utilizada ya que al usar un 8% de la masa de los sustratos se ve cómo afecta la reacción porque a mayor cantidad de enzima mejor será la interacción de ésta con la mezcla grasa reaccionante y así se logra un mayor reordenamiento en las cadenas de los triglicéridos.

Gráfica 6. Triglicéridos en la mezcla grasa Vs tiempo de reacción. Tercer ensayo preliminar



En la gráfica 6 se puede apreciar el comportamiento de algunos triglicéridos presentes en la mezcla grasa los cuales influyen en la composición de los triglicéridos de interés. Los dos primeros son el TAG PPP y el PPS+PSP los cuales aumentan su porcentaje de triglicéridos en todo el tiempo de reacción quedando con una composición de 17,19 % y 16,73% respectivamente, esto se debe a que el ácido palmítico se desplaza hacia estos triglicéridos afectando así la composición de los TAG's de interés (POP y POS) como se muestra en la gráfica 8. Con respecto a los TAG's PSS y SSS se observa que su comportamiento es creciente en las seis horas de reacción pues sus composiciones aumentan un 10,92% y 3,62% respectivamente, lo cual genera que la composición de los triglicéridos POS y SOS se vea afectada debido a que estos triglicéridos están compitiendo por el ácido esteárico presente en la mezcla grasa. Por estas razones la mezcla grasa obtenida en la experimentación no se asemeja a un equivalente de la manteca de cacao.

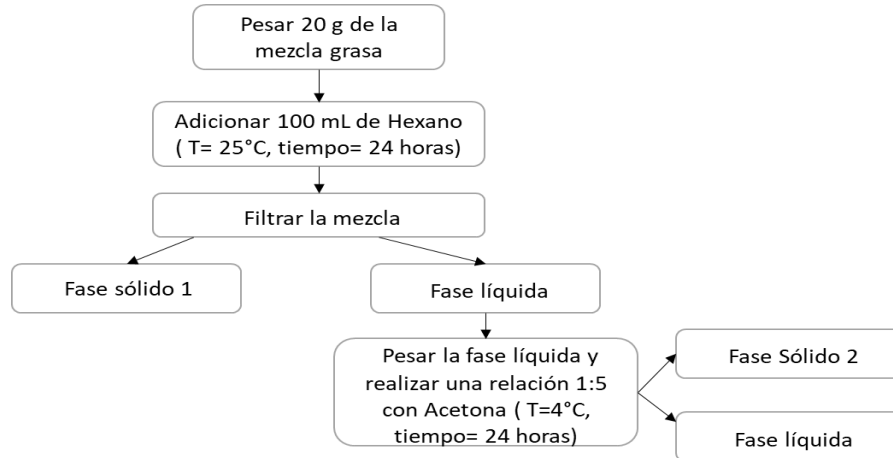
Una vez efectuados los ensayos preliminares y obtenidos sus respectivos resultados, se determinaron las variables para un posterior estudio mediante el desarrollo de un diseño experimental. Las variables escogidas fueron: **Relación p/p en un rango de 1:1,5 a 1:3 y Temperatura en un rango de 60°C a 66°C**, de igual manera, se va a trabajar con variables constantes que son: tiempo de 5 horas, porcentaje de enzima en la mezcla, de 10% y una agitación de 450 RPM.

Como materias primas se va a emplear oleína de palma y ácido esteárico (con una pureza mayor a 33%) ya que en segundo ensayo preliminar las composiciones de los triglicéridos de interés son más similares a las de una manteca de cacao.

2.2.5 Fraccionamientos de referencia. Los fraccionamientos solo se realizan en los ensayos preliminares pues son de referencia con el fin de saber si el procedimiento realizado es similar a los encontrados en la literatura descrita en el numeral 2.1, además de conocer en qué fase se obtiene la mezcla grasa con más similitud a la manteca de cacao con respecto a los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS).

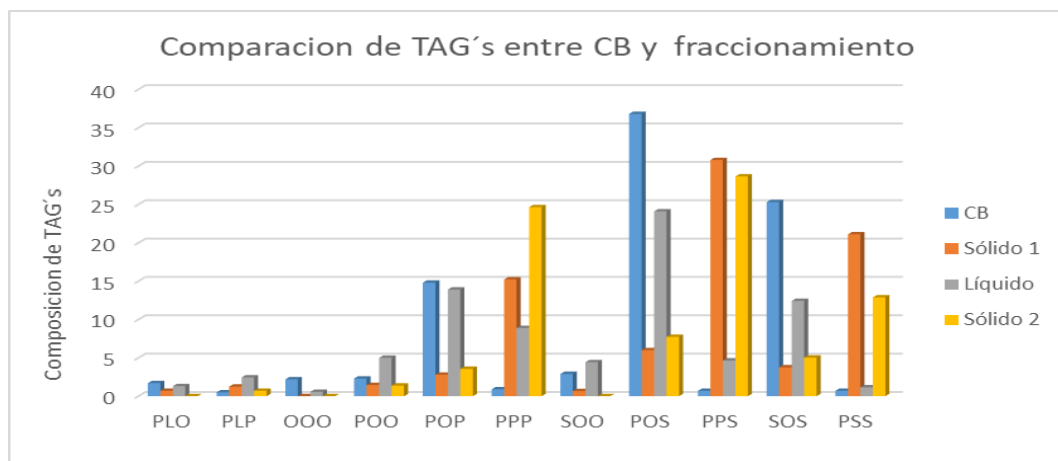
2.2.5.1 Descripción fraccionamiento del primer ensayo preliminar. Una vez termina el tiempo de reacción, se toman 20 g de la mezcla grasa a la cual se le agregan 100 mL de hexano en un frasco el cual debe estar sellado y a temperatura ambiente (25°C) por un día para su posterior filtración y con la fase líquida obtenida y después eliminar el solvente presente, se realiza un segundo fraccionamiento en una relación 1:5 con solvente (Hexano) y se obtienen las fases líquida y sólida 2, el procedimiento se encuentra descrito en el diagrama 5.

Diagrama 5. Descripción del fraccionamiento ensayo preliminar 1



2.2.5.1.1 Resultados del fraccionamiento del primer ensayo preliminar. La manteca de cacao de referencia fue tomada del artículo “Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents”⁵⁵.

Gráfica 7. Comparación de triglicéridos del CB de referencia y el fraccionamiento del experimento preliminar 1



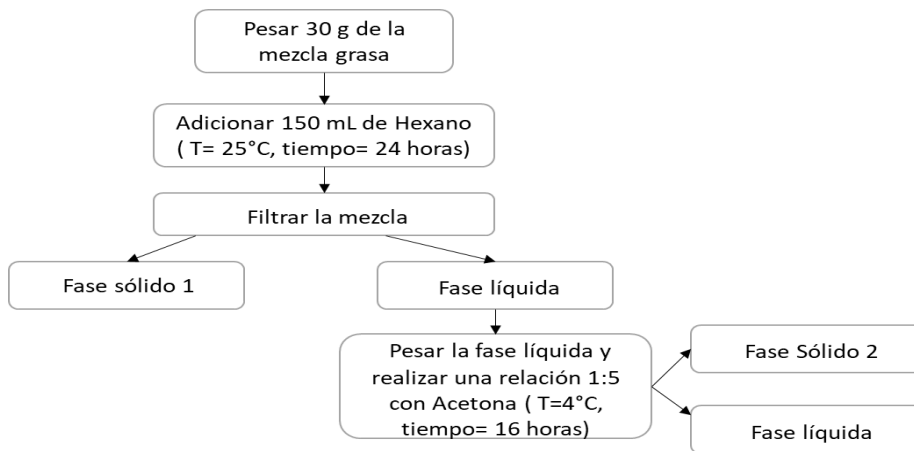
⁵⁵ S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan; Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents. En As. J. Food Ag-Ind. 2009. Pag. 813.

La gráfica 7 muestra una comparación de triglicéridos entre la manteca de cacao de referencia y las fases obtenidas durante el fraccionamiento de la mezcla grasa, esto, con el fin de visualizar cuál de las fases se asemeja más a los TAG's de interés (POP, POS y SOS). Para esta experimentación la **fase líquida es la de interés** sin embargo las composiciones de los triglicéridos POP, POS y SOS están por debajo de los de la manteca de cacao en un 0,9%;12,71% y 12,88% respectivamente, lo que significa que en las siguientes experimentaciones se debe buscar el aumento de los triglicéridos POS y SOS para poder asemejarse a las composiciones que presenta la manteca de cacao y así poder caracterizarse como un CBE.

2.2.5.2 Descripción del fraccionamiento para el segundo ensayo preliminar.

Se efectúan 2 fraccionamientos de la siguiente manera: en el primero se toman 30 g de la mezcla grasa y a esta cantidad se agregan 150 mL de hexano en un frasco el cual se debe sellar y a una temperatura de 25°C por 24 horas para su posterior filtración, con la fase líquida obtenida y después eliminar el solvente presente se realiza un segundo fraccionamiento en una relación 1:5 con solvente (Hexano) se lleva a una temperatura de 4°C por 16 horas y se obtienen las fases líquida y sólida 2, el procedimiento se encuentra descrito en el diagrama 6.

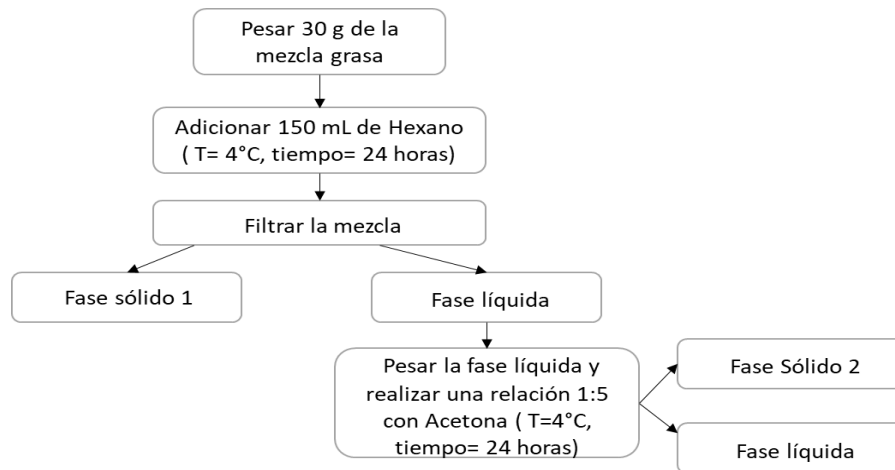
Diagrama 6. Descripción del fraccionamiento 1 realizado en el segundo ensayo preliminar



Para el segundo fraccionamiento el cual está descrito en el diagrama 7, se deben pesar 30 g de la grasa obtenida al final de la reacción, se le agregan 150 mL de hexano un frasco el cual debe ser sellado y llevado a 4°C por 24 horas. Posteriormente se hace la filtración de la mezcla y con la fase líquida se vuelve a hacer la relación 1:5 con el solvente (Acetona) este recipiente es llevado a 4°C durante 24 horas para poder hacer la debida filtración y obtener la fase líquida y sólida 2. Este procedimiento está basado en el procedimiento B del artículo

“Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like Fat from Enzymatically interesterified Palm Olein”.⁵⁶

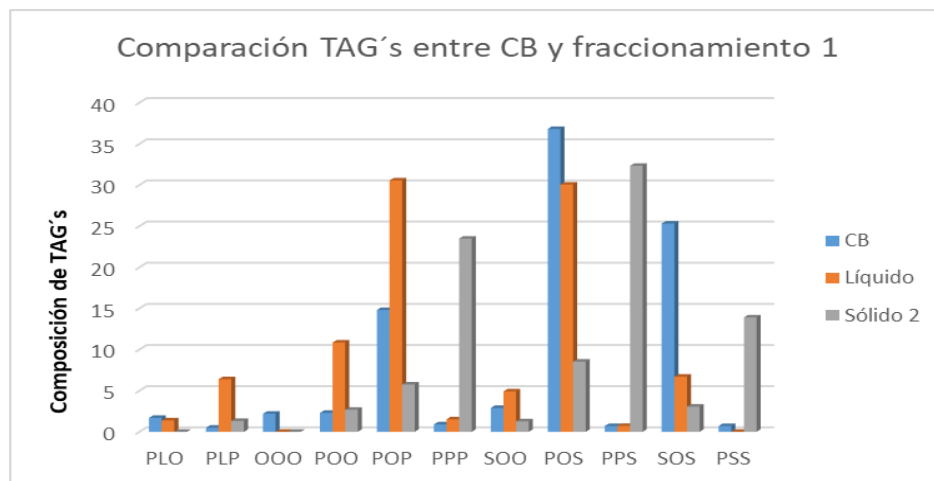
Diagrama 7. Descripción del fraccionamiento 2 realizado en el segundo ensayo preliminar



2.2.5.2.1 Resultados de los fraccionamientos del segundo ensayo preliminar.

Para los dos fraccionamientos realizados en este ensayo preliminar se usa la misma manteca de cacao de referencia basada en el artículo “Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents”⁵⁷ con el fin de visualizar cuál de las fases del fraccionamiento se asemeja más a la manteca de cacao.

Gráfica 8. Comparación de TAG´s del CB de referencia y el fraccionamiento 1 del experimento preliminar 2.

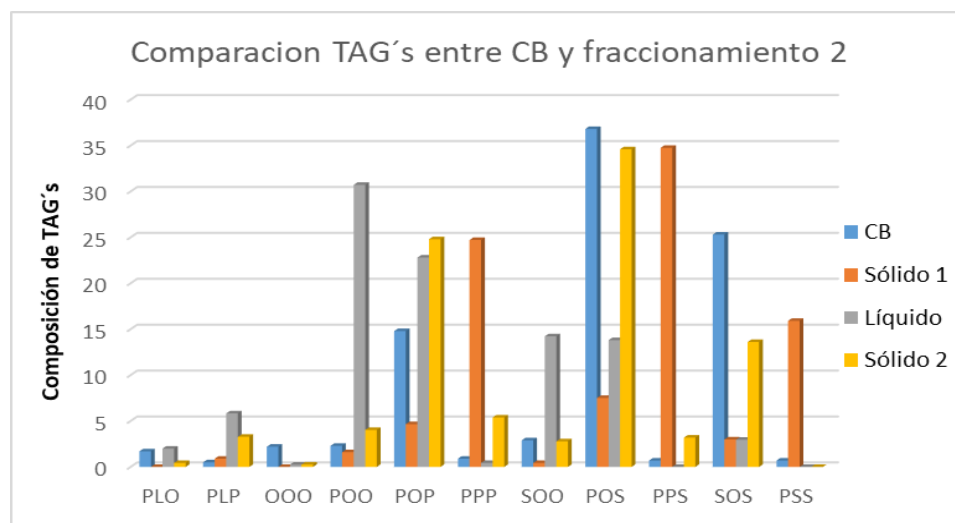


⁵⁶ C.N. Chong, Y.M. Hoh, C.W. Wang, Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like Fat from Enzymatically interesterified Palm Olein. En Springer Science 1992, vol 69. Pg 138.

⁵⁷ S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan; Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents. En As. J. Food Ag-Ind. 2009. Pag. 806- 816.

En esta gráfica se obtiene que la fase de interés del primer fraccionamiento realizado (descrito en el diagrama 6) **es la fase líquida**, dónde se puede observar que los TAG de interés como lo son el POP y el POS tienen mayores porcentajes comparados con la fase sólida 2, sin embargo al compararla con la manteca de cacao de referencia se puede evidenciar que el TAG POP está un 15,74% por encima de la composición de la manteca de cacao y con respecto al TAG SOS la composición que se obtiene en el fraccionamiento está un 18,6% por debajo de la composición de dicha manteca de cacao, por lo tanto esta mezcla grasa obtenida no puede describirse como un CBE. En este fraccionamiento no se logra obtener la fase sólida 1 por lo cual no se especifica en la gráfica.

Gráfica 9. Comparación de TAG's del CB de referencia y el fraccionamiento 2 del experimento preliminar 2.

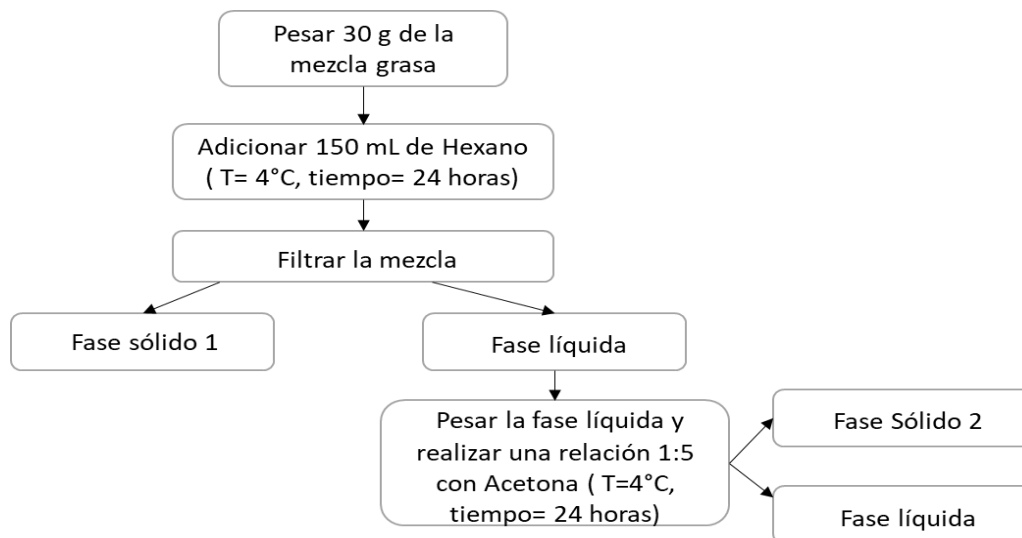


En el segundo fraccionamiento realizado en esta experimentación se muestran las fases obtenidas y la comparación con respecto a la manteca de cacao de referencia y según la gráfica 9, la fase que más se parece a los triglicéridos de interés es la **Sólido 2**; dónde se observa que el POP presenta una composición por encima de la manteca de cacao, específicamente un 10,79%, por lo tanto, se debe buscar disminuir la composición de este TAG en los siguientes experimentos; los triglicéridos POS y el SOS por el contrario presentan una composición menor a la requerida para llegar ser una manteca de cacao (2,21 % y 11,7% respectivamente) con lo cual se puede concluir que la mezcla grasa obtenida en esta experimentación no puede caracterizarse como un CBE.

2.2.5.3 Descripción del fraccionamiento para el tercer ensayo preliminar. Se toman 30 g de la mezcla grasa para hacer el fraccionamiento (descrito en el diagrama 8) a esta cantidad se agregan 150 mL de hexano en un frasco el cual debe estar sellado y a una temperatura de 4°C por 24 horas para su posterior filtración; con la fase líquida obtenida se realiza una relación 1:5 con solvente (Acetona) con una temperatura de 4°C por 24 horas y después se obtienen las fases líquida y sólida 2. Este procedimiento está basado en el procedimiento B del

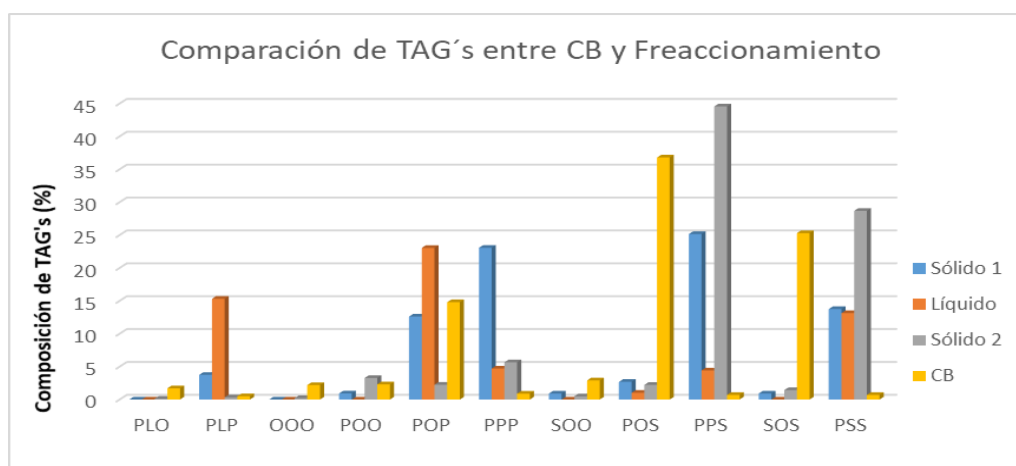
artículo “Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like Fat from Enzymatically interesterified Palm Olein”.⁵⁸

Diagrama 8. Descripción del fraccionamiento realizado en el tercer ensayo preliminar



2.2.5.3.1 Resultado del fraccionamiento del tercer ensayo preliminar. La manteca de cacao de referencia fue tomada del artículo “Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents”⁵⁹.

Gráfica 10. Comparación de triglicéridos del CB de referencia y el fraccionamiento del tercer ensayo preliminar.



⁵⁸ C.N. Chong, Y.M. Hoh, C.W. Wang, Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like Fat from Enzymatically interesterified Palm Olein. En Springer Science 1992, vol 69. Pg 138.

⁵⁹ S. Soekopitojo*, P. Hariyadi, T. R. Muchtadi and N. Andarwulan; Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the production of cocoa butter equivalents. En As. J. Food Ag-Ind. 2009. Pag. 806- 816.

Gracias a la comparación realizada en la gráfica 10 se puede observar que la fase de interés para esta experimentación es **la fase sólida 1**, sin embargo, los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) están por debajo de la composición de la manteca de cacao de referencia en un 2,18%, 34,12% y 24,48% respectivamente. Los resultados del fraccionamiento no son buenos porque la mezcla grasa al final de la reacción no tiene una buena composición de los triglicéridos de interés (POP 16,86%; POS 3,74% y SOS 1,34%) como se muestra en la gráfica 8, lo cual no favorece significativamente ninguna de las fases obtenidas al momento de fraccionar la mezcla y compararla con la manteca de cacao de referencia indicando que no se obtuvo un CBE en el experimento realizado.

Una vez terminados los tres ensayos preliminares, se observa que el mejor ensayo en cuanto al porcentaje de triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) fue el segundo ensayo; con una relación de 1:2 (oleína de palma-acido esteárico), porcentaje de enzima del 10%, agitación de 400 RPM, tiempo de reacción de 4 horas y temperatura de 60°C. En los tres ensayos se puede evidenciar que hay un aumento consecutivo del triglicérido POS, por encima del POP y el SOS debido al reordenamiento en las posiciones 1 y 3 de las cadenas de los TAG's realizado por la enzima, haciendo que los ácidos esteárico y palmítico se desplacen hacia otros TAG's disminuyendo principalmente la composición del SOS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, se va a realizar un diseño de experimentos que involucre las variables escogidas (Relación, Temperatura, tiempo de reacción, cantidad de enzima y agitación), así como la pureza de las materias primas a usar por cada set de experimentos, de tal manera que se identifiquen los datos con las mejores condiciones para obtener un CBE.

3. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE CBE.

Para la determinación de las condiciones de operación, se programa un diseño experimental en el que se puedan evaluar las variables establecidas en el capítulo anterior y encontrar cuales son las mejores condiciones para obtener un producto similar a un CBE. El diseño establecido se va a dividir en dos secciones debido a dos materias primas diferentes utilizadas, de cada experimento se va a tomar una muestra por hora por un tiempo total de 5 horas, se varía en el transcurso de los experimentos las condiciones de Relación y Temperatura y se mantiene constantes cantidad de enzima, agitación y tiempo de reacción. Una vez realizado el diseño experimental y obtenidas las muestras, se hace un análisis cromatográfico solo de las 8 primeras muestras por un problema con el cromatógrafo en la planta; para los siguientes experimentos de la primera parte, se hace un análisis cromatográfico de una hora específica en la reacción; así como para todo el desarrollo de la segunda parte del desarrollo experimental.

En este capítulo se define las materias primas comprometidas en el diseño de experimentos, la cantidad de experimentos a realizar los equipos utilizados y procedimientos desarrollados, así mismo, se especifica un análisis de resultados con la ayuda del Software estadístico llamado MiniTab 18.

3.1 MATERIAS PRIMAS

3.1.1 Oleína de palma. Otorgada por la empresa SIGRA S.A. Descrita en el numeral 2.2.1.1

3.1.2 Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei”. Otorgada por la empresa SIGRA S.A. Descrita en el numeral 2.2.1.4

3.1.3 Ácido esteárico. (Pureza media). Este compuesto se adquiere del distribuidor “*Químicos el alquimista*” y se clasifica según su pureza como “PUREZA MEDIA”; (Presentación sólida en escamas y de color blanco). Este ácido esteárico se selecciona con el fin de aumentar el porcentaje de pureza ya que en la tesis descrita en el numeral 2.1.3.2 se obtienen buenos resultados con respecto al contenido de grasa sólida de una manteca de cacao de referencia. Se realiza un análisis de cromatografía de gases basado en la norma NTC 4967 (Según norma interna de la empresa SIGRA S.A) (**Ver ANEXO B**), con el fin de obtener el perfil de ácidos grasos de este ácido el cual tiene una composición de (32,9% palmítico-61,5% esteárico) (**Ver ANEXO C**) logrando así un aumento en el porcentaje de ácido esteárico para poder asemejarse al ácido empleado en la tesis mencionada anteriormente.

Imagen 19. Ácido esteárico “pureza media”



3.1.4 Ácido esteárico. (Pureza alta). Este compuesto se adquiere del distribuidor “*AppliChem Panreac*” y se clasifica según su pureza como “PUREZA ALTA”, el cual tiene un 98% de pureza (Ver ANEXO A). Se selecciona este ácido esteárico porque en las fuentes de información descritas en los numerales 2.1.1.3 y 2.1.1.4 se obtienen buenos resultados de productos semejantes a un CBE, además en dichas fuentes se utiliza como materia prima un ácido de esteárico con una pureza del 98,3%, generando así al momento del fraccionamiento composiciones de los TAG’s de interés (POP, POS y SOS) similares a la manteca de cacao que emplearon como referencia.

Imagen 20. Ácido esteárico” *AppliChem Panreac*”



3.2 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

Los equipos e instrumentos usados para la realización del diseño experimental fueron los mismos que se emplearon en los ensayos preliminares, los cuales están descritos en el numeral 2.2.2, específicamente en el cuadro 1.

El montaje experimental para el desarrollo de la reacción de interesterificación enzima es el mismo descrito en el numeral 2.2.3.

3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se hicieron dos diseños de experimentos diferentes; el primer diseño está basado en el ácido esteárico de “PUREZA MEDIA”, especificado en el numeral 3.1.1. Para

el segundo diseño de experimentos se hizo un cambio en la procedencia de la materia prima (Ácido esteárico), se trabajó con la materia de “PUREZA ALTA”.

Primero se realiza la descripción del diseño de experimentos con el ácido esteárico de pureza media. Se establecen las variables independientes (temperatura, relación) y las variables dependientes (tiempo, Agitación, cantidad de enzima) en el transcurso del diseño de experimentos, de igual manera, se especifican los niveles y factores usados para este diseño.

En la segunda parte, se realiza una descripción del segundo diseño de experimentos, en el cual se trabaja con el ácido esteárico de pureza alta, en se especifica la cantidad de experimentos obtenidos como las condiciones independientes usadas en cada uno de los experimentos.

3.3.1 Realización del diseño de experimentos para el ácido esteárico de pureza media. Se realizó un diseño factorial completo, el cual es un diseño en el que se miden las respuestas para todas las combinaciones de niveles de los factores, se realizaron tres niveles con dos factores (3^2). Primero, se obtiene el número de experimentos a realizar, que para el diseño factorial completo descrito anteriormente, corresponde a un total de 9 experimentos. El primer factor hace referencia a las temperaturas con las que se van a trabajar cada uno de los experimentos obtenidos en el diseño en un rango de 60°C a 66°C, las temperaturas dichas provienen de la búsqueda de información bibliográfica (Artículos, Patentes y Tesis) descritas en el numeral 2.1. El segundo factor hace alusión a las relaciones para cada una de las materias primas involucradas en el diseño de experimentos; (Oleína de palma y Ácido esteárico de pureza media) estas relaciones están en un rango de 1:1,5 a 1:3, igual que el primer factor, la elección de las relaciones provienen de la búsqueda de información bibliográfica (Artículos, Patentes y Tesis) descritas en el numeral 2.1.

Los 3 niveles en el diseño de experimentos fueron obtenidos al igual que los factores descritos anteriormente a partir de una recopilación de información de las búsquedas bibliográficas descritas en el numeral 2.1 y resumidos en la Tabla 8.

En el diseño de experimentos, los niveles están categorizados en posiciones de menor a mayor número, siendo temperatura de 60°C y relación de 1:1,5 el nivel bajo y temperatura de 66°C con relación de 1:3 el nivel alto. Como se indica en la tabla 16.

Tabla 16. Distribución de los niveles de los factores del diseño de experimentos.

Factor	Bajo	Medio	Alto.
Temperatura	60	63	66
Relación (oleína de palma: Ácido esteárico)	1:1,5	1:2,25	1:3

Una vez escogidos los niveles por cada factor, se hace una combinación manual de los datos para adquirir el diseño el diseño de experimentos factorial completo para un total de 9 experimentos. El diseño de experimentos se detalla con mayor facilidad en la tabla 17.

Tabla 17. Distribución de los factores dependientes del diseño de experimentos, con ácido esteárico de pureza media.

Experimento	Temperatura	Relación (Oleína de palma: Ácido esteárico "Pureza Media")
1	60°C	1:1,5
2	60°C	1:2,25
3	60°C	1:3
4	63°C	1:1,5
5	63°C	1:2,25
6	63°C	1:3
7	66°C	1:1,5
8	66°C	1:2,25
9	66°C	1:3

Una vez obtenido el diseño de experimentos se anexan réplicas centrales, las cuales están conformadas por los puntos medios de los dos factores.

	Temperatura	Relación (Oleína de Palma: Ácido esteárico "Pureza Media")
Replica central 1	63°C	1:2,25
Replica central 2	63°C	1:2,25

El uso de repeticiones centrales es una de las formas para saber la variabilidad y estimar el error experimental para de esa manera afianzar los datos con los que se está trabajando.

3.3.2 Realización del diseño de experimentos para el ácido esteárico de pureza alta. Se realizó un diseño factorial completo de tres niveles con dos factores (3^2). Primero, se obtiene el número de experimentos a realizar, que para el diseño factorial completo descrito anteriormente, corresponde a un total de 9 experimentos. El primer factor hace referencia a las temperaturas con las que se van a trabajar cada uno de los experimentos obtenidos en el diseño en un rango de 60°C a 66°C, las temperaturas dichas provienen de la búsqueda de información bibliográfica (Artículos, Patentes y Tesis) descritas en el numeral 2.1. El segundo factor hace alusión a las relaciones para cada una de las materias primas involucradas en el diseño de experimentos; (Oleína de palma y ácido esteárico de alta pureza) estas relaciones están en un rango de 1:0,91 a 1:1,37, igual que el primer factor, la elección de las relaciones provienen de la búsqueda de bibliográficas descritas en el numeral 2.1 y resumidos en la Tabla 8.

Cuando ya se han escogido los niveles por cada factor, se hace una combinación manual de los datos para adquirir el diseño el diseño de experimentos factorial completo. El diseño de experimentos se detalla con mayor facilidad en la tabla 18.

Tabla 18. Distribución de las variables independientes del diseño de experimentos, con ácido esteárico de alta pureza.

Experimento	Temperatura	Relación (oleína de palma: Ácido esteárico “pureza alta”)
1	60°C	1:0,91
2	60°C	1:1,37
3	60°C	1:1,83
4	63°C	1:1,37
5	63°C	1:0,91
6	63°C	1:1,83
7	66°C	1:0,91
8	66°C	1:1,37
9	66°C	1:1,83

Seguidamente del diseño de experimentos, se anexan réplicas centrales, las cuales están conformadas por los puntos medios de los dos factores.

	Temperatura	Relación (oleína de palma: Ácido esteárico “Pureza Alta”)
Replica central 1	63°C	1:1,37
Replica central 2	63°C	1:1,37

Una vez especificadas las variables independientes tanto para la primera parte como para la segunda parte del diseño de experimentos, se procede a detallar las variables dependientes involucradas en los dos diseños. La reacción enzimática se va a efectuar libre de solventes durante todo el tiempo de reacción, el tiempo establecido para la reacción es de 5 horas, en las que se va a tomar una muestra de la mezcla grasa cada hora. Durante dicho tiempo, se emplea agitación mecánica de 450 revoluciones por minuto, la enzima utilizada es *Lipozyme IM, Rhizomocur Miehei*, y su peso en la reacción de 10% p/p de la masa total. Posteriormente la reacción finalice, el producto es conservado para su posterior fraccionamiento y análisis y la enzima es rápidamente limpiada con acetona y filtrada con una bomba de vacío para su próximo uso.

3.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA PRIMERA PARTE DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS (Ácido esteárico “Pureza Media”)

Debido a complicaciones con el equipo de cromatografía de gases solo se pudieron obtener los resultados del perfil de triglicéridos de los primeros 8

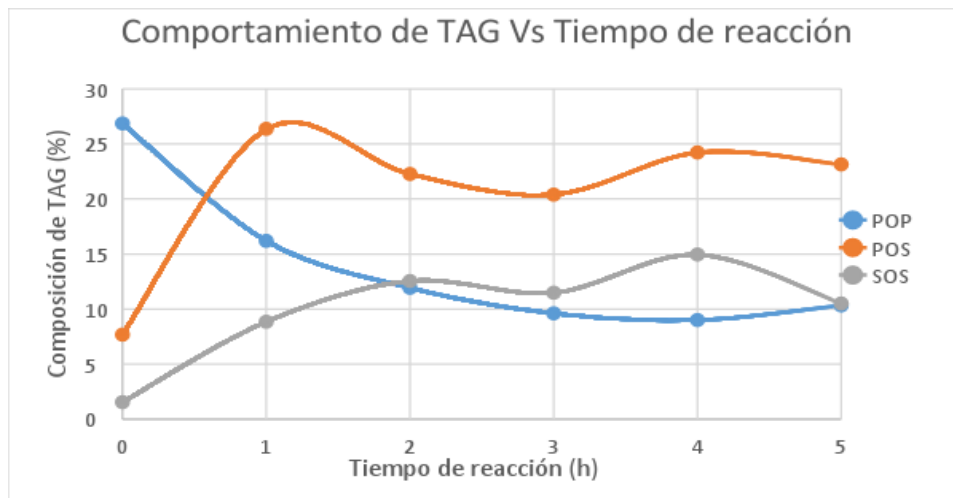
experimentos en todo el tiempo de reacción (5 horas) (Ver ANEXO E). En los ensayos 9, 10 y 11 solo se obtuvo el perfil de triglicéridos de la hora 4 por esta razón las gráficas hasta el experimento 8 se analizan en función del tiempo de reacción.

Con los porcentajes de triglicéridos obtenidos en el análisis de cromatografía para los primeros 8 experimentos (Ver ANEXO E) se realizan dos gráficas, en la primera de ellas se encuentran los tres TAG's de interés (POP, POS y SOS) y se muestra el comportamiento de estos con respecto al tiempo de reacción y en la segunda gráfica se destacan algunos triglicéridos presentes en la mezcla grasa y que tienen composiciones altas a medida que transcurre la reacción de interesterificación enzimática.

Posteriormente se realiza el análisis de varianza con ayuda del software Minitab 18 tomando en cuenta solo los perfiles de triglicéridos obtenidos en la cuarta hora de reacción para los tres principales TAG's (POP, POS y SOS), así mismo se realiza el análisis de las gráficas de superficie respuesta y de contorno con el fin de determinar qué efecto tienen las variables escogidas en el diseño experimental.

3.4.1.1 análisis de resultados Experimento 1 (T:63°C; R:1:2,25) (Replica central).

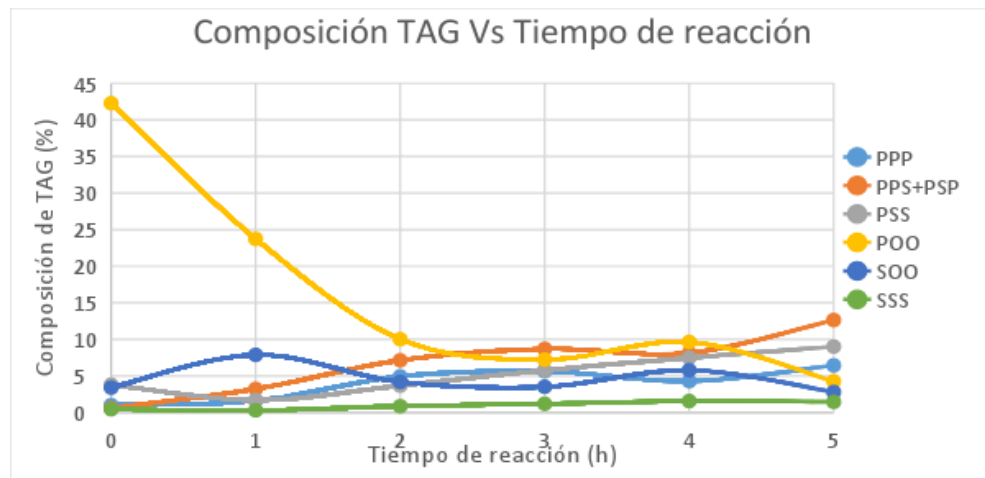
Gráfica 11. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 1



En la gráfica 11 se observa que el triglicérido POP inició en la reacción con una composición de 26,86% la cual en todo el tiempo de reacción disminuye hasta un valor de 10,33% este comportamiento se debe a que el ácido palmítico presente en la mezcla grasa se desplazó hacia otros triglicéridos diferentes a los de interés como lo son el PPS+PSP y el TAG PPP. Con respecto al TAG POS se evidencia que su composición tiene el mayor incremento en la primera hora de reacción pasando de un valor de 7,68% a uno de 26,37%; al finalizar la reacción esta composición disminuye un 3,23% lo cual se debe a que el ácido oleico se desplaza a triglicéridos como el POO, además que las composiciones de los

triglicéridos PPP y PSS incrementan notoriamente en el transcurso de la primera hora de reacción generando que la composición del TAG POS se vea afectada. El SOS empezó la reacción con una composición de 1,55% sin embargo en el transcurso del tiempo su composición aumenta hasta un 8,96% al final de la reacción, esto se debe a que el ácido esteárico se desplaza hacia los triglicéridos PSS, SSS.

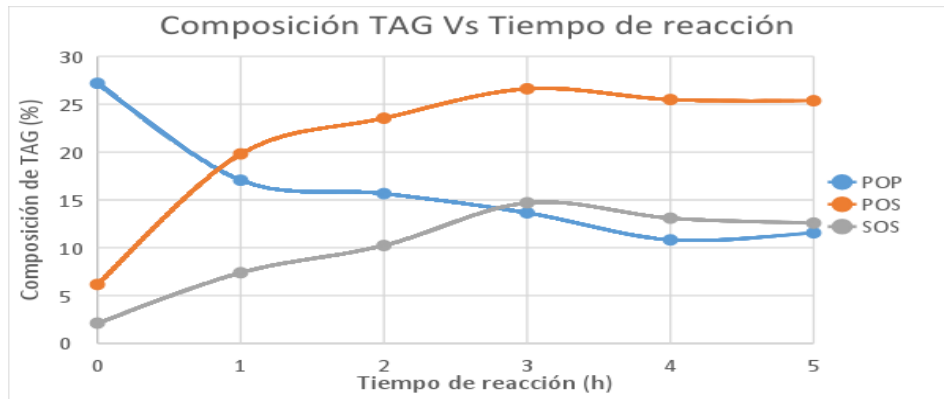
Gráfica 12. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 1.



En la gráfica 12 sobresalen diferentes TAG debido a su comportamiento en la reacción, como lo es el PSS; inicialmente empieza con una composición de 3,8% y como se aprecia en la gráfica tiene una disminución significativa en la primera hora de reacción quedando con una composición de 1,7%, finalmente esta composición aumenta un 7,31% debido a que la cantidad de ácido palmítico y ácido esteárico presente en la mezcla grasa tienen más afinidad hacia este triglicérido. Con respecto al TAG PPS+PSP se observa un aumento en su composición a lo largo del tiempo de reacción obteniendo así un valor de 12,64%, este incremento se debe a que en el reordenamiento de las cadenas de los triglicéridos el PPS+PSP se ve favorecido con el ácido palmítico presente en la mezcla grasa impidiendo la formación de los TAG's de interés (POS). El comportamiento del TAG POO decrece significativamente hasta la tercera hora de reacción pasando de una composición de 42,28% a una de 7,24%, en la cuarta hora de reacción su composición aumenta un 2,41%; esto se debe a la afinidad del ácido palmítico y oleico por este triglicérido en esta hora de reacción. Por último, el comportamiento del SSS muestra un aumento leve en su composición en las 5 horas de reacción pasando de un valor inicial de 0,45% a un valor final de 1,46% este comportamiento beneficia la formación del triglicérido de interés SOS como se observa en la gráfica 1 porque el ácido esteárico presente en la mezcla grasa muestra más afinidad hacia este TAG.

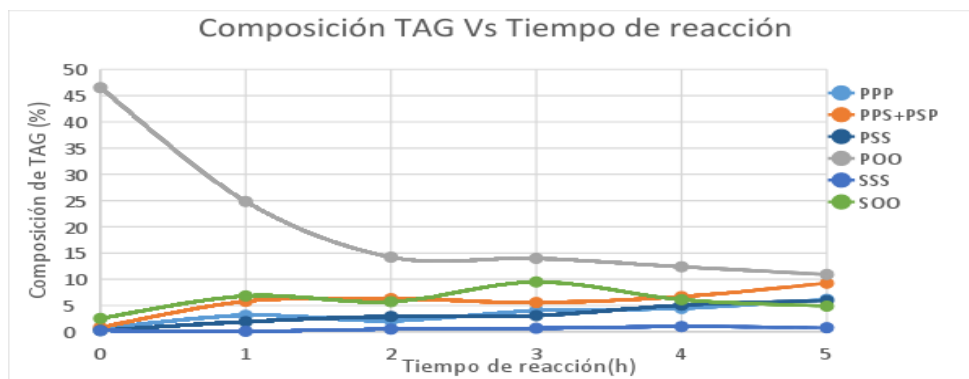
3.4.1.2 Análisis de resultados experimento 2 (T:60°C; R: 1:1,5).

Gráfica 13. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 2



Como se observa en la gráfica 13 el comportamiento del TAG POP durante el transcurso de la reacción es decreciente empezando con una composición de 27,19% y terminado con un valor de 11,56% este comportamiento es ocasionado por el reordenamiento que genera la reacción de interesterificación enzimática pues el ácido palmítico presente en la mezcla grasa se desplazó hacia los TAG's PPS+PSP; PPP y el TAG PSS. El triglicérido POS inicia la reacción con una composición de 6,16% la cual aumenta a medida que transcurre el tiempo de reacción quedando con una composición final de 25,37% esto se debe a que los ácidos esteárico y palmítico se desplazan a triglicéridos como el PSS, SOO y también hacia el TAG SOS el cual es de interés. Por último, el SOS muestra un aumento en su composición a medida que avanza el tiempo de reacción pues inicia con un valor de 2,12% y termina con un incremento del 10,46% gracias a que el ácido esteárico presenta mayor afinidad hacia este TAG, así como al POS los cuales son de interés para la obtención de un equivalente de la manteca de cacao.

Gráfica 14. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 2.

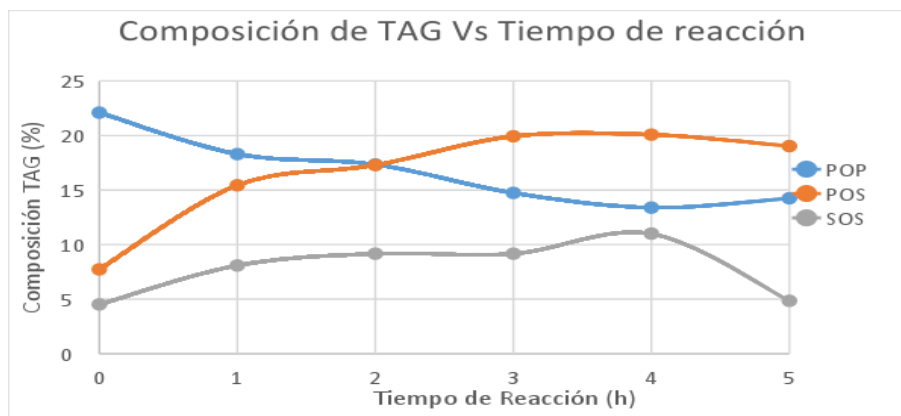


En la gráfica 14 se observan otros TAG's presentes en la mezcla grasa los cuales sobresalen debido a su comportamiento en la reacción de interesterificación como lo es el POO el cual presenta la mayor composición en el tiempo cero con un valor

de 46,52% y como se evidencia en la gráfica su composición tiene un descenso significativo en todo el tiempo de reacción quedando con un valor de 10,92% este comportamiento favorece la formación de triglicéridos de interés como lo son el POS y el SOS como se puede observar en la gráfica 3 . El TAG PPS+PSP muestra un incremento del 8,42% en su composición al final de la reacción, este incremento se debe a que el ácido palmítico procedente de las materias primas (oleína de palma- ácido esteárico) se desplaza hacia este triglicérido, así como al TAG PPP el cual aumenta su composición en un 5,59% hace más difícil la formación de los TAG de interés para esta experimentación. El último triglicérido que se destaca en la gráfica es el SOO el cual presenta un aumento en su composición pues pasa de un valor de 2,54% a uno de 4,89% al terminar el tiempo de reacción indicando que el ácido esteárico y oleico tienen más afinidad con otros TAG presentes en la mezcla grasa que reacciona.

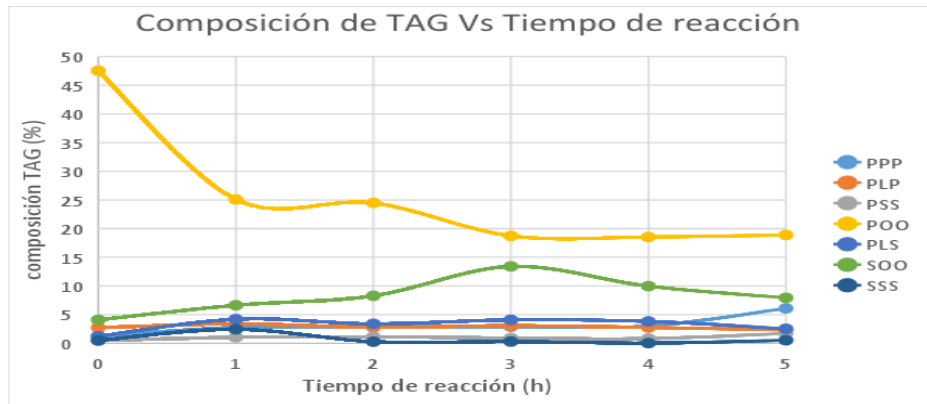
3.4.1.3 Análisis de resultados experimento 3 (T:60°C; R: 1:2,25)

Gráfica 15. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 3.



Se puede ver que el TAG POP inició la reacción con una composición de 22,1% la cual disminuye hasta un valor de 14,25% al finalizar el tiempo de reacción este comportamiento se debe a que el ácido palmítico que está presente en este triglicérido y en las materias primas utilizadas se desplaza hacia los TAG's PPS+PSP; PPP y el TAG PLP. El triglicérido POS presenta un aumento significativo en su composición pues pasa de un valor de 7,73% a un valor de 19,03%; porque los ácidos esteárico y palmítico que se encuentran en la mezcla grasa se desplazan a triglicéridos como el POO lo cual beneficia la formación del triglicérido de interés (POS) ya que en la gráfica 6 se observa como este TAG va disminuyendo a medida que la reacción se lleva a cabo. El TAG SOS empieza la reacción con una composición de 4,52% la cual tiene un aumento hasta la cuarta hora de reacción tomando un valor máximo de 11,01% en su composición, pero en la última hora esta disminuye en un 6,16% indicando así que en esta experimentación la composición del TAG SOS se ve influenciado con el tiempo de reacción.

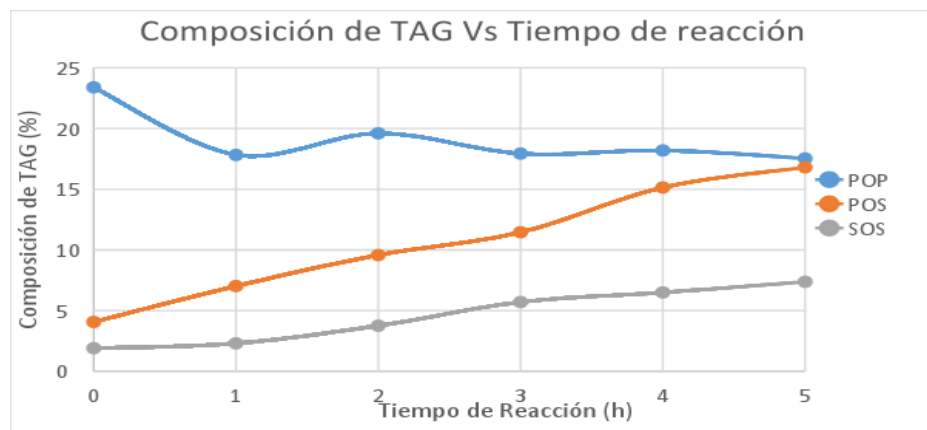
Gráfica 16. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 3.



La gráfica 16 destaca diferentes TAG's como lo es el POO; el cual presenta una caída con respecto a su composición pues inicia con un valor de 47,53% y termina la reacción con un valor de 18,90%, este comportamiento se debe al reordenamiento en las cadenas de los triglicéridos generado por la interesterificación enzimática con lo cual se ve favorecida la formación de triglicéridos de interés como lo son el POS y el SOS. El TAG SOO presenta un aumento en su composición en el tiempo de reacción pasando de un valor de 4,1% a uno de 7,93% este incremento se debe a que el ácido esteárico y oleico procedente de las materias primas utilizadas se desplaza más hacia este TAG y no al SOS el cual es uno de los triglicéridos de interés. El TAG PPP muestra un aumento en su composición en las cinco horas de reacción pues pasa de una composición de 1,28% a una de 6,08% al terminar el experimento, lo cual no es bueno para la formación de los TAG de interés (POP, POS y SOS) pues el ácido palmítico presente en las materias primas se está desplazando a este triglicérido y a otros como el PLP y el PPS+PSP.

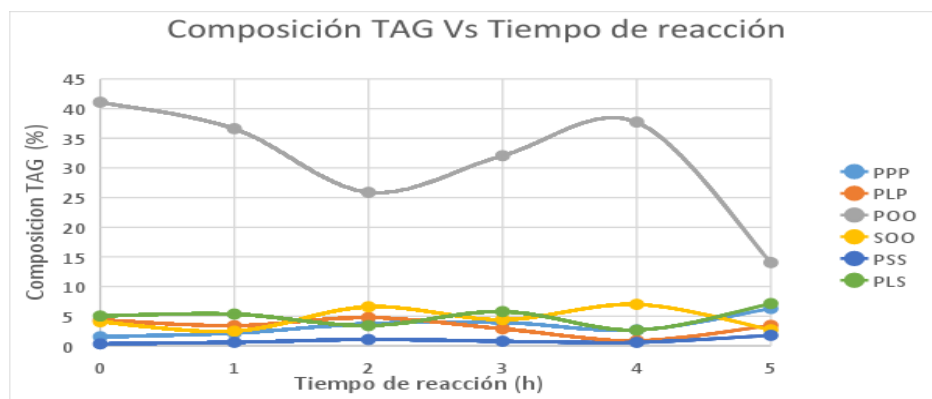
3.4.1.4 Análisis de resultados experimento 4 (T: 60°C; R: 1:3).

Gráfica 17. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 4



En la gráfica 17 se observa que el triglicérido POP inició la reacción con una composición de 23,4% la cual disminuye a medida que transcurre el tiempo de reacción terminando con una composición de 17,54% este comportamiento se debe a que el ácido palmítico que está presente en la reacción se desplaza hacia los TAG's PLS; PPP y el TAG PLP. El triglicérido POS presenta un aumento constante en su composición en todo el tiempo de reacción pasando de un valor de 4,07% a un valor de 16,81% al terminar la reacción enzimática, esto se genera gracias a que el ácido esteárico y palmítico que están presentes en las materias primas se desplazan a triglicéridos como el PPP y el PSS impidiendo que el triglicérido de interés pueda tener mayor composición. El triglicérido SOS empieza la reacción con una composición de 1,91% la cual aumenta hasta un valor final de 7,38% lo que implica que el reordenamiento generado en la reacción de interesterificación enzimática favorece en parte a la formación de los TAG de interés (POP, POS y SOS) ya que triglicéridos como el POO se reordenan de tal forma que genera el aumento en la composición de otros triglicéridos como el POS.

Gráfica 18. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 4

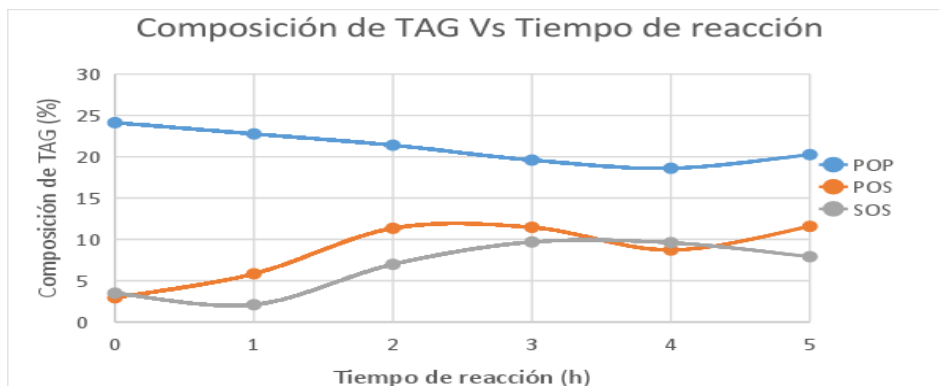


La gráfica 18 muestra diferentes TAG presentes en la mezcla grasa los cuales sobresalen debido a su comportamiento en la reacción, como lo es el POO; el cual empieza con un valor de 41,08%, este presenta altas y bajas en los porcentajes de su composición terminando así con un valor de 14,04%; su comportamiento se puede deber a que con la reacción de interesterificación el reordenamiento de los triglicéridos cambie beneficiando la formación de triglicéridos de interés como lo son el POS y el SOS en varias horas así como en otras horas de reacción el reordenamiento de estos triglicéridos beneficie al POO el cual en principio decrecía con respecto a su composición. El TAG PPP muestra un aumento en su composición a lo largo del tiempo de reacción pues al iniciar tenía un valor de 1,52% y al final de la reacción su composición fue de 6,29%, el incremento de este triglicérido se debe a que el ácido palmítico procedente de las materias primas se desplaza a este triglicérido. El triglicérido SOO presenta un aumento y disminución de su composición en el tiempo de reacción como se observa en la gráfica pues empieza con un valor de 4,06 % y termina la reacción con un valor de 2,07%

indicando que el ácido esteárico y oleico tienen más afinidad con otros TAG presentes en la mezcla grasa que reacciona.

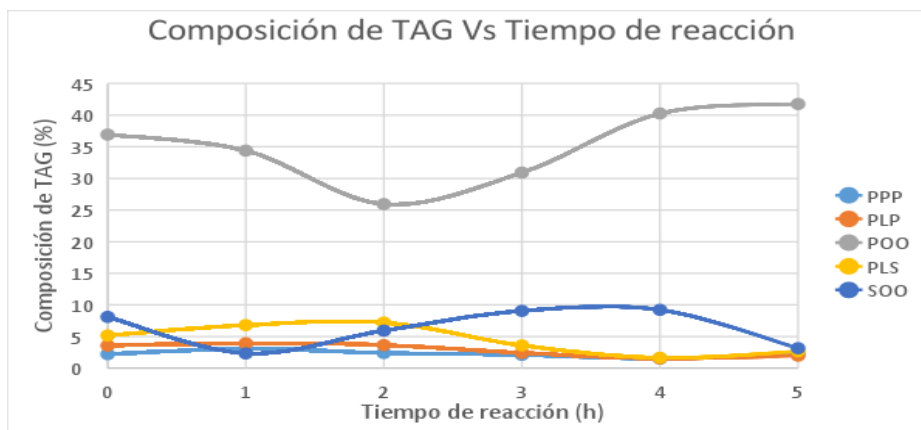
3.4.1.5 Análisis de resultados experimento 5 (T:63°C; R: 1:2,25).

Gráfica 19. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 5.



Se puede observar que el POP inició la reacción con una composición de 24,11% la cual disminuye quedando con un valor de 20,25%, la disminución en cuanto a la composición de este triglicérido se debe a que el ácido palmítico se desplazó hacia los TAG's PLP, PLS y el TAG PPP. El POS presenta un aumento en su composición a medida que transcurre la reacción pasando de un valor de 2,94% hasta un valor de 11,57% este comportamiento se debe a que el ácido palmítico y oleico se desplaza a triglicéridos como el POO o el PPP lo que genera que la composición del triglicérido de interés no aumente significativamente en el transcurso de la reacción. El triglicérido SOS empieza la reacción con una composición de 3,49% la cual aumenta hasta un valor de 7,90% en la última hora de reacción, su comportamiento se debe a que el ácido esteárico presente en la mezcla grasa se desplaza hacia los triglicéridos PSS, SSS y el ácido oleico se dirige al TAG POO lo cual en ciertas horas de la reacción puede beneficiar a triglicéridos como el POS y el SOS.

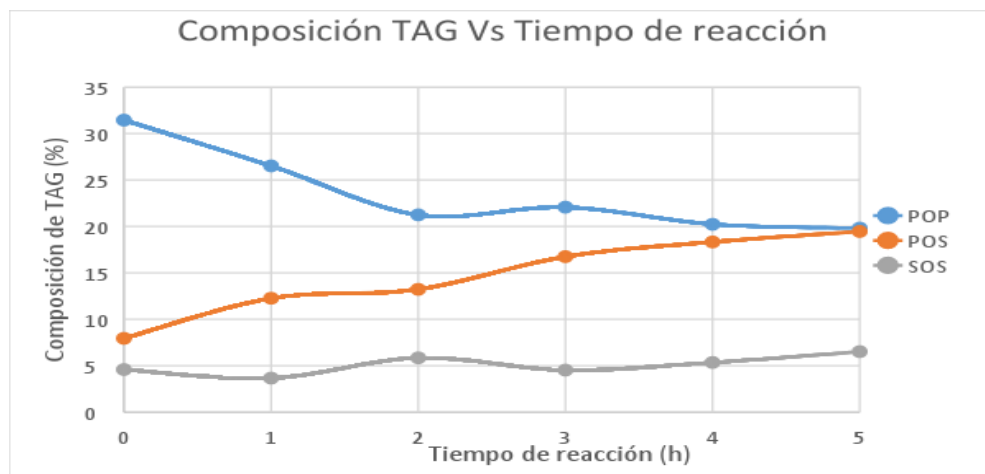
Gráfica 20. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 5.



Se puede apreciar el comportamiento de diferentes triglicéridos también presentes en la mezcla grasa de los cuales sobresalen el TAG POO en el que al inicio de la reacción tiene un valor de 36,92, su composición disminuye y aumenta a lo largo de la reacción terminando con un valor de 41,77%, el comportamiento de este triglicérido afecta la composición de los triglicéridos de interés para la experimentación pues impide un crecimiento significativo en la composición del POS y el SOS (gráfica 19). El TAG PPP muestra un comportamiento diferente en cada hora de reacción pues sus composiciones aumentan y disminuyen comenzando la reacción con un valor de 2,21% y terminando con un valor de 2,21%, la formación de este triglicérido para el experimento es bueno pues la cantidad que se forma a medida que transcurre la reacción no es significativa y así no afecta la formación de los triglicéridos de interés (POP ,POS) pues los dos tienen ácido palmítico en sus posiciones 1 y 3 de la cadena del TAG. Por último, el triglicérido SOO comienza la reacción con una composición de 8,11% y como se aprecia en la gráfica esta composición disminuye hasta un valor de 3,15%, este triglicérido afecta la formación del TAG de interés SOS pues sus composiciones son similares en el transcurso de la reacción generando que el reordenamiento de los triglicéridos no favorezca el aumento de la composición del triglicérido de interés.

3.4.1.6 Análisis de resultados experimento 6 (T:63°C; R: 1:1,5).

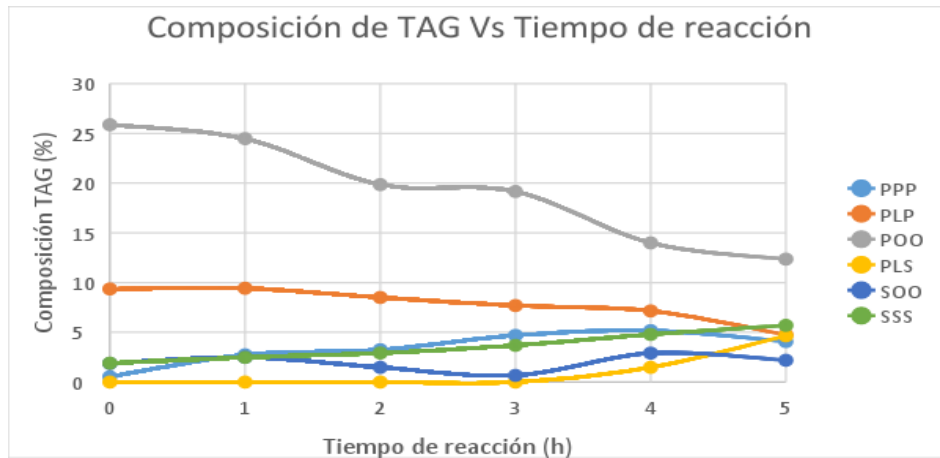
Gráfica 21. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 6



El comportamiento del triglicérido POP muestra una disminución en cuanto a su composición en todo el tiempo de reacción pues pasa de un valor inicial de 31,46% hasta un valor de 19,83%, esto se debe a que el ácido palmítico se desplazó hacia los TAG's, PPP, PPS+PSP y PLP. El POS inicia la reacción con una composición de 7,96 este triglicérido muestra un comportamiento creciente en todo el transcurso de la reacción pues termina con una composición de 19,47%, esto se debe a que el ácido palmítico y esteárico se desplaza hacia este triglicérido de interés, así como el POO disminuye su composición con el fin de aportar una mayor composición al POS. El triglicérido SOS empezó la reacción

con una composición de 4,6% la cual aumenta hasta un valor de 6,53% pero esta composición no es semejante a la composición de una manteca de cacao y el comportamiento de este triglicérido se debe a que el ácido esteárico se desplaza hacia los triglicéridos SSS, SOO y el ácido oleico se dirige al TAG POO lo cual en ciertas horas de la reacción puede beneficiar a triglicéridos como el POS y el SOS.

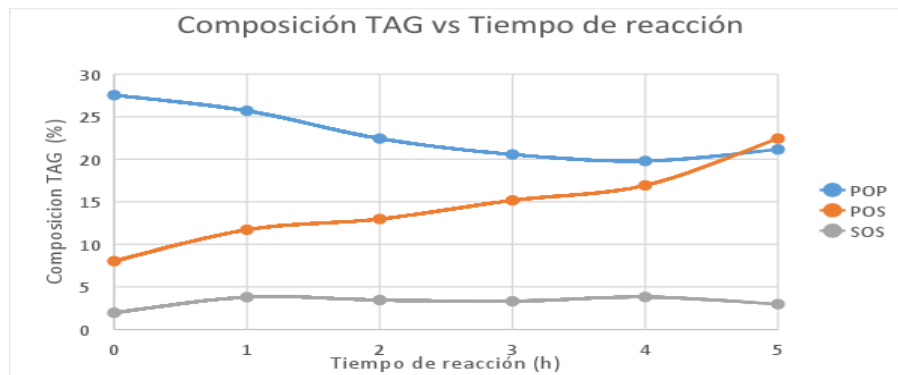
Gráfica 22. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 6.



En esta gráfica se puede apreciar el comportamiento de diferentes triglicéridos de los cuales sobresalen el TAG POO en el que al inicio de la reacción tiene un valor de 25,87%, su comportamiento es decreciente en todo el tiempo de reacción obteniendo así un valor de 12,36% al finalizar la experimentación; el comportamiento este triglicérido beneficia la composición de los triglicéridos de interés para la experimentación pues ayuda al aumento en la composición del triglicérido POS el cual es de interés. El TAG PPP muestra un aumento en su composición pasando de un valor de 2,74% a uno de 4,07% al finalizar la reacción. La formación de este triglicérido significa una disminución en la composición de los triglicéridos de interés pues impide que el ácido palmítico se reordene en la cadena de los TAG de interés. El TAG SSS muestra un aumento en su composición iniciando con un valor de 1,9% hasta un valor de 5,7% lo cual implica que la formación de este triglicérido es similar a la composición del TAG SOS por lo cual este triglicérido de interés no tiene buenos resultados para esta experimentación. El TAG SOO inicia la reacción con una composición de 1,87% la cual incrementa hasta un valor de 2,19% lo cual indica que este triglicérido compite por los ácidos esteárico y oleico presentes en la mezcla grasa.

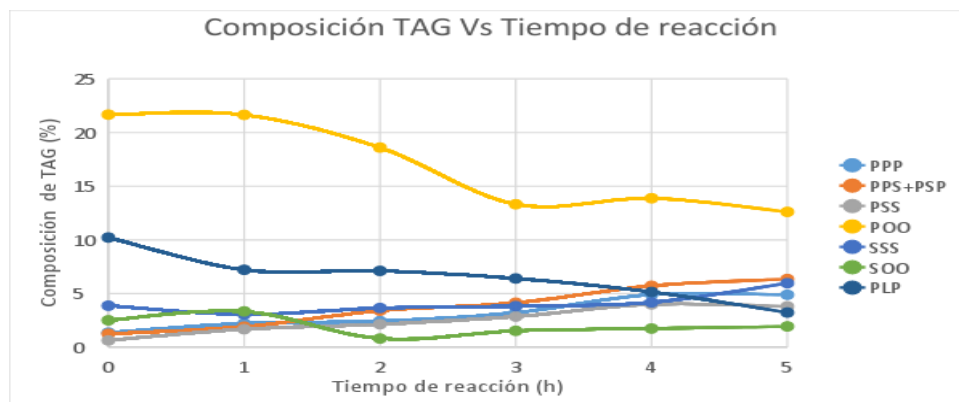
3.4.1.7 Análisis de resultados experimento 7 (T:63°C; R: 1:3).

Gráfica 23. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 7



En la gráfica 23 se observa el comportamiento de los tres triglicéridos de interés, el POP tiene un comportamiento decreciente en todo el tiempo de reacción pasando de una composición de 27,53% a una de 21,15%, esto se debe a que el ácido palmítico presente en la mezcla grasa también se está desplazando hacia los TAG's, PPP, PPS+PSP y PSS. El POS inicia la reacción con una composición de 8,03% este triglicérido muestra un comportamiento ascendente en todo el transcurso de la reacción pues culmina con un valor de 22,43% lo cual indica que el ácido palmítico y esteárico se desplaza hacia este triglicérido de interés, este triglicérido también se ve beneficiado por el comportamiento del TAG POO el cual presenta una disminución del 9,06% en su composición con el fin de aportar una mayor composición al POS. El triglicérido SOS empezó la reacción con una composición de 1,97% la cual aumenta hasta un valor de 2,98% este comportamiento se debe a que el ácido esteárico es desplazado hacia los triglicéridos SSS, SOO y el ácido oleico se dirige al TAG POO lo cual en ciertas horas de la reacción puede beneficiar a triglicéridos como el POS y el SOS. En esta experimentación la reacción de interesterificación enzimática no beneficia el triglicérido SOS pues el ácido esteárico parece tener más afinidad con las cadenas de otros triglicéridos.

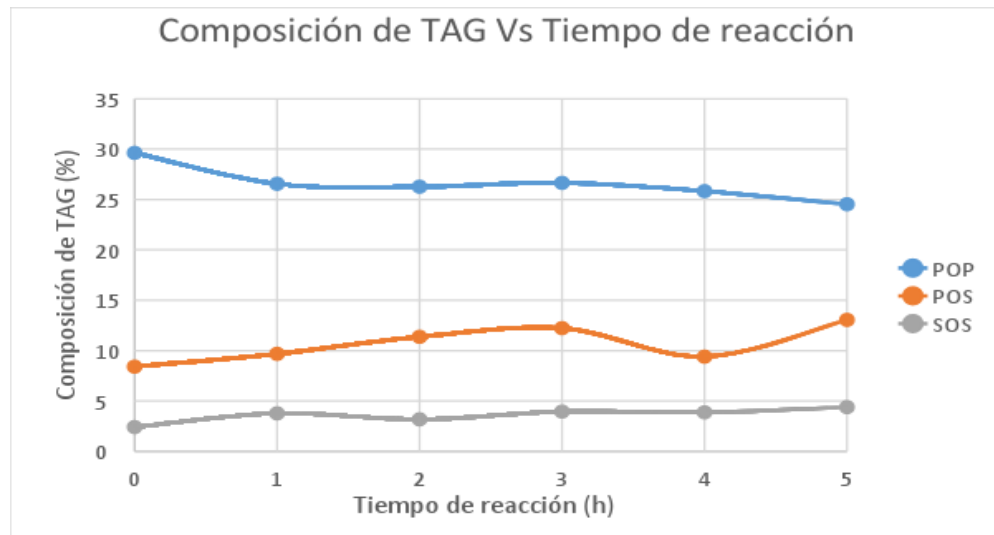
Gráfica 24. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 7



Esta gráfica destaca a TAG's como el POO el cual presenta una disminución en su composición en todo el transcurso de la reacción pues inicia con un valor de 21,67% y termina con una composición de 12,61% el comportamiento de este triglicérido afecta la composición de los triglicéridos de interés para la experimentación pues impide un crecimiento significativo en la composición del POS y el SOS como se aprecia en la gráfica 13. El TAG PPP tiene un aumento en su composición comenzando con un valor de 1,36% y culminando con una composición de 4,89%; esto significa que los triglicéridos de interés POP y POS están compitiendo por el ácido palmítico presente en la mezcla grasa pues requieren de él en las posiciones 1 y 3 de sus respectivas cadenas lo cual impide que el PPP aumente su composición. El TAG SOO inicia la reacción con una composición de 2,51% la cual desciende hasta un valor final de 1,94% lo que significa este triglicérido afecta la formación del TAG de interés SOS pues sus composiciones son similares en el transcurso de la reacción generando que el reordenamiento de los ácidos grasos en las posiciones 1 y 3 del triglicérido no favorezca el aumento de la composición del triglicérido de interés pues están compitiendo por el ácido esteárico presente en la mezcla grasa.

3.4.1.8 Análisis de resultados experimento 8 (T:66°C; R: 1:1,5).

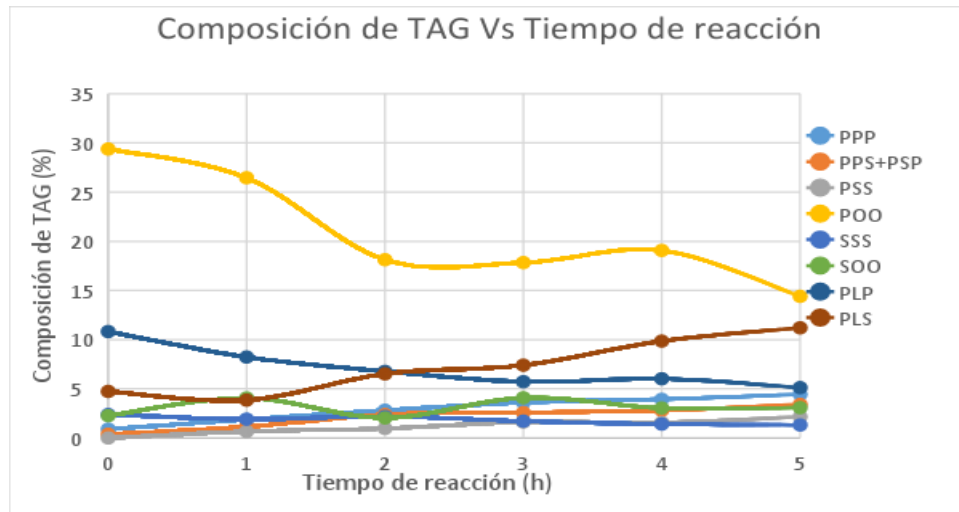
Gráfica 25. Comportamiento TAG de interés Vs tiempo de reacción. Experimento 8



En la gráfica 25 el triglicérido POP presenta un comportamiento decreciente en todo el transcurso de la reacción pues inicialmente su composición fue de 29,63% la cual culmina con un valor de 24,53% indicando así que el ácido palmítico que está presente en la reacción se desplaza hacia otros TAG's como el PPS+PSP; PPP y el TAG PLS. El triglicérido POS presenta un aumento constante en su composición hasta la tercera hora de reacción pasando de un valor de 8,41% en el momento que inicia la reacción hasta un valor de 12,23% para finalmente terminar con un valor de 13,05%; esto se debe a que el ácido esteárico y palmítico que están presentes en las materias primas se desplazan a triglicéridos como el PPP y

el PSS lo que impide que el triglicérido de interés pueda tener mayor composición en el tiempo de reacción. El triglicérido SOS empezó la reacción con una composición de 2,41% el comportamiento de este triglicérido va aumentando ligeramente en el tiempo de reacción pues termina con un valor de 4,39%, lo que implica que el reordenamiento que lleva a cabo la reacción de interesterificación enzimática favorece en parte a la formación de los TAG como el SOO el cual tiene un comportamiento similar al triglicérido de interés SOS.

Gráfica 26. Comportamiento TAG Vs tiempo de reacción. Experimento 8.



En la gráfica 26 se destacan otros triglicéridos presentes en la mezcla grasa como lo son el PLS el cual aumenta su composición en todo el tiempo de reacción pasando de una composición inicial de 4,73% y culminando con un valor de 11,2% lo cual significa que este triglicérido se ve favorecido por el ácido esteárico y palmítico presente en la mezcla grasa por lo cual las composiciones de los TAG's de interés (POS y SOS) no aumentan como se evidencia en la gráfica 15. El POO tiene un descenso en su composición pues inicia con un valor de 29,38% y termina con un valor de 14,4 % por lo cual este comportamiento beneficia la composición de los triglicéridos de interés para la experimentación pues ayuda a que la composición del POS aumente en el transcurso de la reacción. El TAG PPP aumenta su composición en todo el transcurso de la reacción pasando de un valor de 0,9% a uno de 4,44% al finalizar la experimentación esto genera una disminución en la composición de los triglicéridos de interés (POP y POS) pues compiten por el ácido palmítico presente en la mezcla grasa. El TAG SSS inicia la reacción con una composición de 2,39% la cual disminuye hasta un valor de 1,32% lo cual afecta la formación del triglicérido de interés SOS pues el ácido esteárico presente en la mezcla grasa tiene una afinidad hacia estos dos TAG's, así como al triglicérido SOO impidiendo que el TAG SOS tenga una mejor composición.

Tabla 19. Porcentaje de los TAG's de interés en la cuarta hora de reacción para los experimentos realizados con ácido esteárico "Pureza Media".

Análisis	POP	POS	SOS
E1	9,01	24,23	14,96
E2	10,82	25,49	13,09
E3	13,39	20,08	11,01
E4	18,2	15,5	6,5
E5	10,74	20,12	14,10
E6	20,24	18,34	5,36
E7	19,79	16,93	3,82
E8	25,83	9,4	3,87
E9	15,09	26,29	21,85
E10	27,34	34,76	0,46
E11	12,47	16,01	13,23

3.4.2 Análisis de varianza del triglicérido POP en el diseño de experimentos con ácido esteárico de "pureza media". La descripción de las variables y el diseño experimental fue descrita en el numeral 3.3.1., los resultados del diseño de experimentos factorial se muestran en la Tabla 19, la cual especifica los porcentajes obtenidos de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) en la cuarta hora de reacción con el fin de realizar el análisis estadístico.

Tabla 20. análisis de varianza TAG POP. Diseño con ácido esteárico de "pureza media".

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	384,275	76,855	9,62	0,005
Lineal	123,188	61,594	7,71	0,017
Temperatura	111,328	111,328	13,94	0,007
Relación	11,860	11,860	1,48	0,262
Cuadrado	252,485	126,242	15,81	0,003
Temperatura*Temperatura	11,811	11,811	1,48	0,263
Relación*Relación	169,902	169,902	21,27	0,002
Interacción de 2 factores	8,602	8,602	1,08	0,334
Temperatura*Relación	8,602	8,602	1,08	0,334
Error	55,910	7,987		
Falta de ajuste	49,918	16,639	11,11	0,021
Error puro	5,992	1,498		
Total	440,186			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

El análisis estadístico ANOVA para la superficie de respuesta del triglicérido POP, mostro que: La variable de **temperatura** (lineal) y la variable de **Relación** (cuadrático) son significativas porque, el valor $p < \alpha$, siendo $\alpha = 0,05$, lo cual indica que son variables que influyen en TAG POP.

La ecuación Cuadrática con el mejor ajuste encontrado para el Triglicérido POP es:

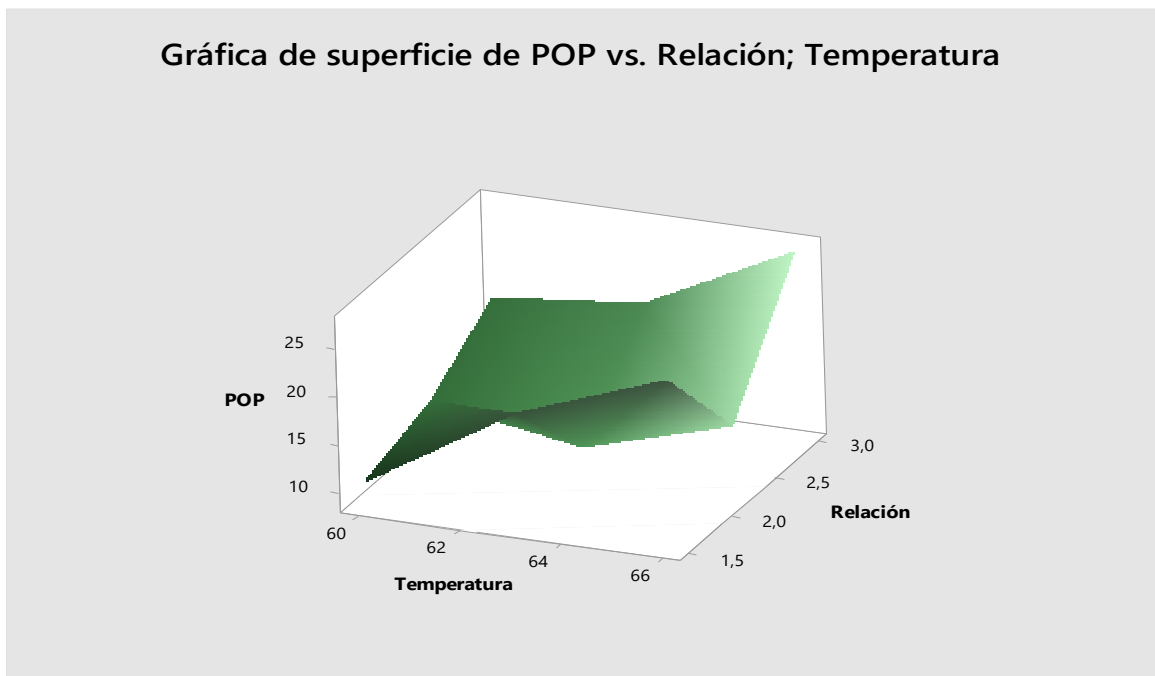
Ecuación 1. Triglicerido POP Ácido esteárico "Pureza Media"

$\text{POP} = 807 - 26,0 \text{ Temperatura} - 19,8 \text{ Relación} + 0,230 \text{ Temperatura} * \text{Temperatura} + 13,94 \text{ Relación} * \text{Relación} - 0,652 \text{ Temperatura} * \text{Relación}$

El valor de R^2 fue de 0.873, el valor de "R² Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.7823, el valor p del modelo es menor a 0,05 indicando que este modelo se ajusta.

3.4.2.1 Análisis de la gráfica de superficie de POP

Gráfica 27. Superficie de POP vs relación y temperatura. Acido "pureza Media"

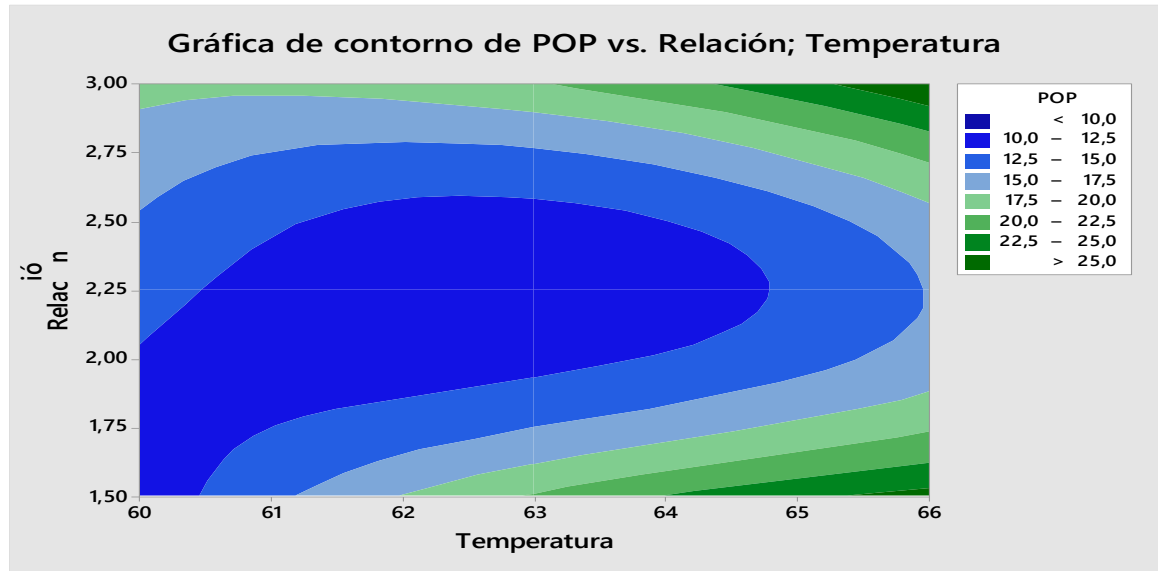


Fuente. Minitab 18 Statistical software.

Las gráficas de superficie y contorno muestran que a mayor temperatura y mayor relación (T: 66°C y R: 1:3) la composición del TAG POP aumenta a un valor de 27,34% (pico más significativo en la gráfica). Por el contrario, si se toman la temperatura y relación más bajas (T:60°C y R:1:1,5) el valor de POP disminuye por lo tanto no hace que cumpla con las características de composición para llegar a ser un CBE. Para lograr un porcentaje similar a la manteca de cacao (15%-20%)

en este diseño experimental y con respecto al TAG POP se necesita la temperatura más baja (60°C) y una relación media (1:2,25).

Gráfica 28. Contorno de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.4.2.2 Análisis de varianza para el triglicérido POS.

Tabla 21. análisis de varianza TAG POS. Diseño con ácido esteárico de “pureza media”.

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	398,62	79,725	8,32	0,007
Lineal	46,65	23,327	2,43	0,158
Temperatura	15,78	15,784	1,65	0,240
Relación	30,87	30,870	3,22	0,116
Cuadrado	33,34	16,670	1,74	0,244
Temperatura*Temperatura	30,22	30,215	3,15	0,119
Relación*Relación	13,90	13,901	1,45	0,268
Interacción de 2 factores	318,63	318,629	33,26	0,001
Temperatura*Relación	318,63	318,629	33,26	0,001
Error	67,06	9,581		
Falta de ajuste	33,30	11,100	1,31	0,386
Error puro	33,77	8,441		
Total	465,69			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

Gracias al análisis estadística ANOVA para la superficie de respuesta del triglicérido POS se puede evidenciar que la interacción entre las dos variables **(temperatura- Relación)** muestra un efecto significativo con respecto a la variable respuesta (TAG POS) porque el valor p es menor de 0,05.

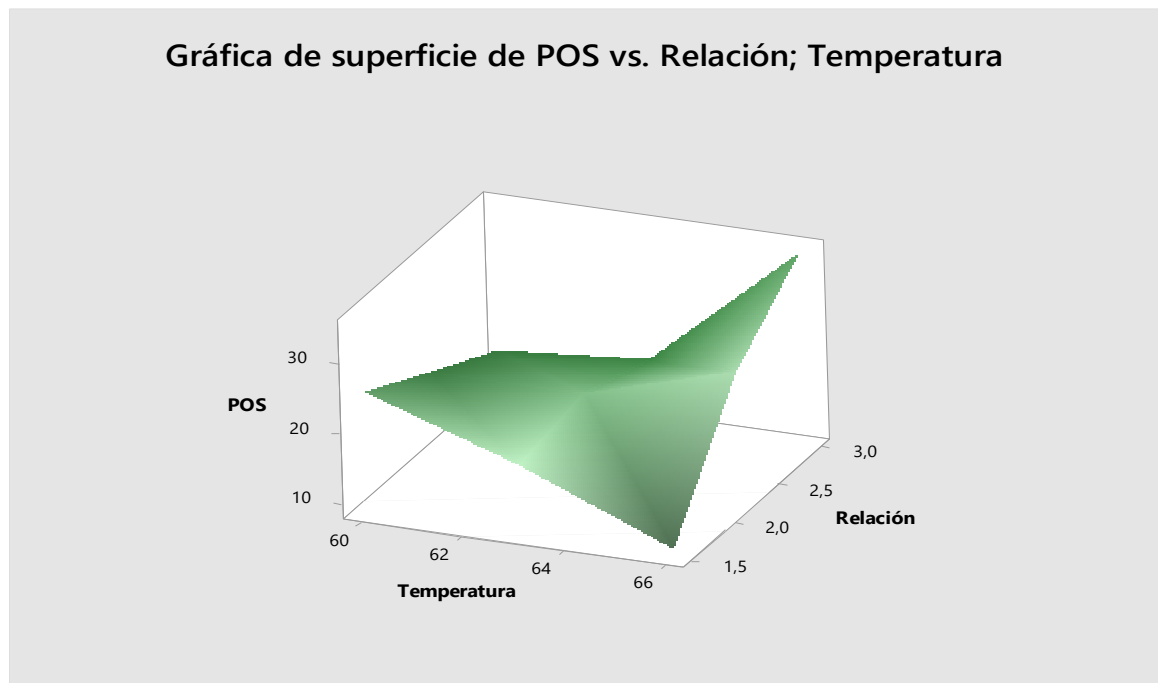
La ecuación cuadrática con el mejor ajuste encontrado para el triglicérido POS es:

Ecuación 2. Triglicérido POS Ácido esteárico "Pureza Media"

$$\text{POS} = 1980 - 54,7 \text{ Temperatura} - 228,9 \text{ Relación} + 0,368 \text{ Temperatura}^2 - 3,99 \text{ Relación}^2 + 3,967 \text{ Temperatura} \cdot \text{Relación}$$

El valor de R^2 fue de 0.856, el valor de " R^2 Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.7531, el valor p del modelo es menor a 0,05 indicando que este modelo se ajusta para el triglicérido POS.

Gráfica 29.Superficie de POS vs relación y temperatura. Acido "pureza Media"

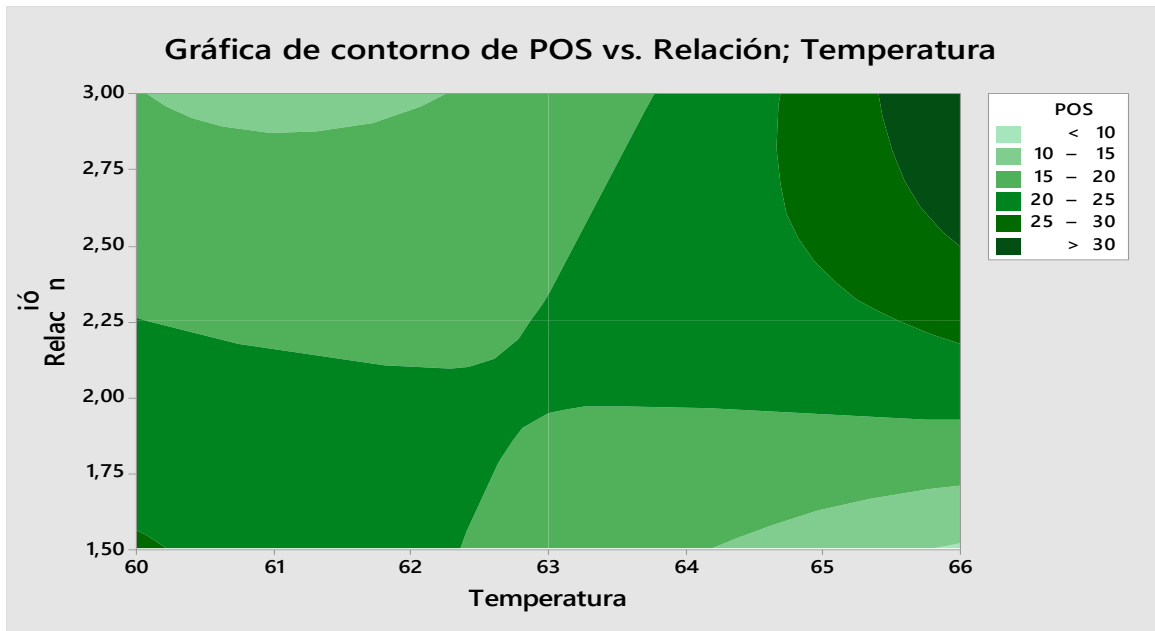


Fuente. Minitab 18 Statistical software

Las gráficas 29 y 30 muestra el efecto que tienen las variables (Temperatura – Relación) con respecto a la variable respuesta (POS). Por ejemplo, con un valor de temperatura y relación altas (T:66°C y R: 1:3) la concentración del triglicérido de interés POS llega a su valor máximo (34,76%) como se evidencia en la gráfica 29 al ser el pico más significativo. Por otro lado, si la relación utilizada es la más baja (R: 1:1,5) y la temperatura es la más alta (T:66°C) la composición del triglicérido POS se ve afectada de manera drástica llegando a un valor de 9,4%

por lo cual se debe evitar esta interacción para que el triglicérido de interés cumpla con las características para ser un CBE. Con el fin de lograr un porcentaje similar a la manteca de cacao (30% - 35%) respecto al triglicérido POS se necesitan la temperatura y relación más altas escogidas para la realización de este diseño de experimentos (T: 66°C y R: 1:3).

Gráfica 30. Contorno de POS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.4.2.3 Análisis de varianza para el triglicérido SOS. El análisis estadístico ANOVA (Tabla 22) para la superficie de respuesta del triglicérido SOS, mostro que: La variable de **temperatura** no tiene ningún efecto en el modelo analizado con la ayuda del software MniTab 18 porque el valor p fue mayor a 0,05. Por otro lado, la variable de **Relación** (cuadrático) es significativa porque, el valor p fue menor de 0,05 indicando que este término tiene un efecto en cuanto al TAG SOS.

Tabla 22. Análisis de varianza TAG SOS. Diseño con ácido esteárico "Pureza Media".

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	313,966	62,793	3,67	0,060
Lineal	25,451	12,726	0,74	0,510
Temperatura	3,256	3,256	0,19	0,676
Relación	22,195	22,195	1,30	0,292
Cuadrado	285,986	142,993	8,35	0,014
Temperatura*Temperatura	9,738	9,738	0,57	0,475
Relación*Relación	274,109	274,109	16,01	0,005
Interacción de 2 factores	2,528	2,528	0,15	0,712
Temperatura*Relación	2,528	2,528	0,15	0,712
Error	119,814	17,116		
Falta de ajuste	118,317	39,439	105,42	0,000
Error puro	1,496	0,374		
Total	433,779			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

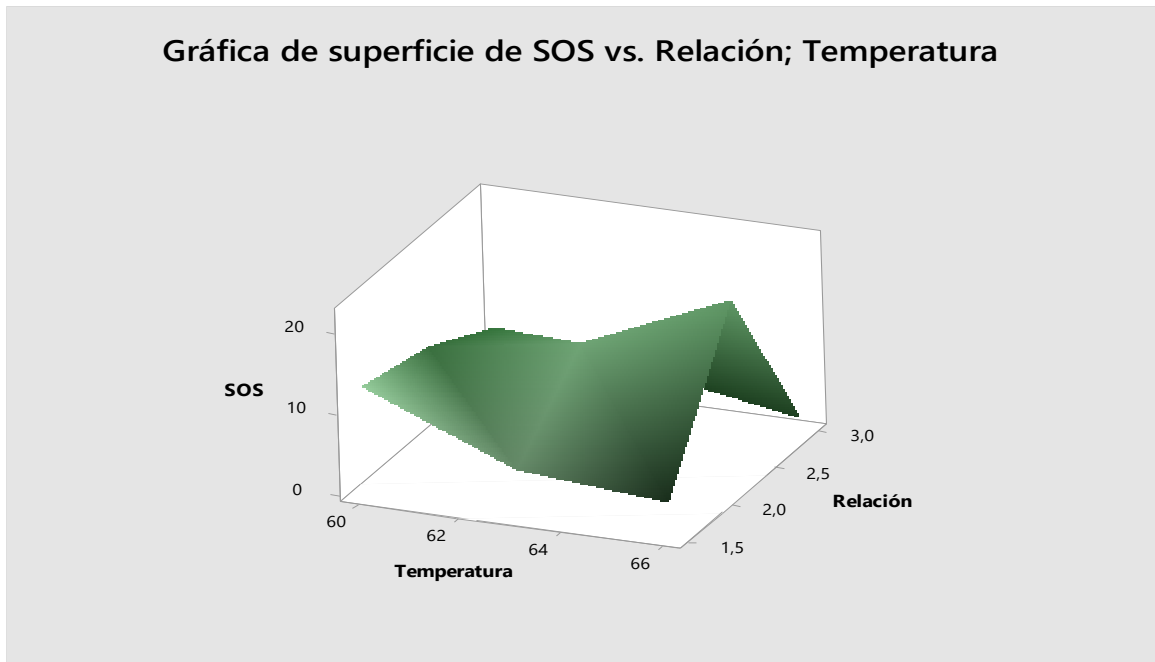
La ecuación cuadrática con el mejor ajuste encontrada para el triglicérido SOS es:

Ecuación 3. Triglicérido SOS Ácido esteárico "Pureza Media"

$$\text{SOS} = 824 - 27,3 \text{ Temperatura} + 54,9 \text{ Relación} + 0,209 \text{ Temperatura*Temperatura} - 17,71 \text{ Relación*Relación} + 0,353 \text{ Temperatura*Relación}$$

El valor de R^2 fue de 0.7238, el valor de " R^2 Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.5265, además el valor p del modelo es mayor a 0,05 indicando que el modelo no se ajusta para la variable respuesta (SOS).

Gráfica 31. Superficie de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”.

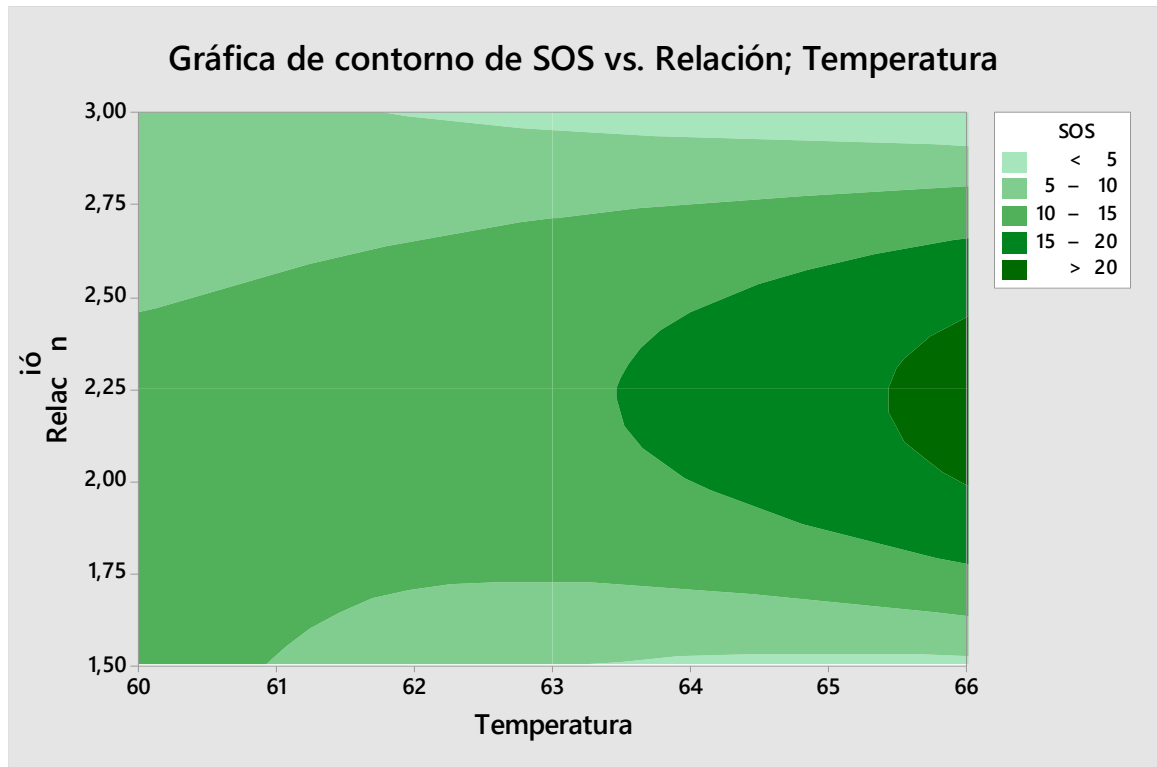


Fuente. Minitab 18 Statistical software

Gracias a las gráficas 31 y 32 se puede observar el efecto que tienen las variables (Temperatura – Relación) con respecto a la variable respuesta (SOS). Por ejemplo, si la temperatura y relación escogidas son el nivel alto (T:66°C y R:1:3) la composición del triglicérido SOS se ve afectada drásticamente llegando a un valor de 0,46%, así mismo pasa con las otras composiciones que tienen la relación (R: 1:3) en común lo que indica que no es la adecuada para favorecer la composición del TAG SOS. Por el contrario, al utilizar el nivel medio de la relación (R:1:2,25) y la temperatura es la más alta (T: 66°C) la composición del triglicérido SOS aumenta a un valor de 21,85% el cual es el pico más significativo de la gráfica 31.

Para lograr una composición similar a la manteca de cacao (25% - 30%) respecto al triglicérido de interés SOS la mejor opción de temperatura y relación son: T:66°C y R: 1:2,25.

Gráfica 32. Contorno de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Media”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.4.3 Análisis de predicción y óptima respuesta para el diseño experimental con ácido esteárico de “Pureza Media”. Con la ayuda del software Minitab 18 se obtuvieron los datos de predicción y optimización para este diseño experimental, con el fin de mostrar los errores estándar de ajuste pronosticado de cada modelo y dejar en evidencia cuál de ellos no se ajusta al diseño; así como, los resultados de la optimización bajo la premisa que dos de las tres ecuaciones se ajustan al modelo del diseño con ácido esteárico de “Pureza media”, con el fin de determinar las mejores condiciones de operación (Relación –Temperatura) para obtener los porcentajes de los triglicéridos de interés con mayor similitud a los de una manteca de cacao los cuales están entre los siguientes rangos: POP (15% - 20%); POS (30% - 35%); SOS (25% - 30%).

Tabla 23. Datos de predicción para los triglicéridos de interés. Diseño de experimentos con ácido de “Pureza Media”.

POP	POP predicción	Error estándar de ajuste pronosticado (POP)	POS	POS predicción	Error estándar de ajuste pronosticado (POS)	SOS	SOS predicción	Error estándar de ajuste pronosticado (SOS)
10,8	13,9	2,5	25,5	26,1	2,8	13,1	9,6	3,7
25,8	25,4	2,5	9,4	11,5	2,8	3,9	6,5	3,7
18,2	19,6	2,5	15,2	12,8	2,8	6,5	4,2	3,7
27,3	25,3	2,5	34,8	33,9	2,8	0,5	4,3	3,7
13,4	8,9	2,0	20,1	21,7	2,2	11,0	16,8	2,9
15,1	17,5	2,0	26,3	25,0	2,2	21,9	15,4	2,9
20,2	17,6	2,0	18,3	15,5	2,2	5,4	6,2	2,9
19,8	20,4	2,0	16,9	20,1	2,2	3,8	2,3	2,9
9,0	11,1	1,2	24,2	20,1	1,3	15,0	14,2	1,7
12,5	11,1	1,2	16,0	20,1	1,3	13,2	14,2	1,7
10,7	11,1	1,2	20,1	20,1	1,3	14,1	14,2	1,7
10,7	11,1	1,2	20,1	20,1	1,3	14,1	14,2	1,7
10,7	11,1	1,2	20,1	20,1	1,3	14,1	14,2	1,7

En esta tabla se muestran los errores estándar de ajuste pronosticado de cada uno de los modelos analizados en este diseño experimental, con lo cual se indica que el modelo para el triglicérido SOS no se ajusta al diseño ya que los errores de predicción son altos en comparación a los otros dos modelos, además en el análisis de varianza el valor p para este modelo es mayor a 0,05 indicando que no se puede ajustar a este diseño experimental realizado con ácido esteárico de “Pureza Media”.

La tabla 24 se realizó utilizando los valores mínimo y máximo de composición de cada uno de los triglicéridos de interés de una manteca de cacao. POP valor mínimo (15%) y valor máximo (20%); POS valor mínimo (30%) y valor máximo (35%); SOS valor mínimo (25%) y valor máximo (30%) con el fin de determinar el rango de las condiciones de operación (Relación – Temperatura).

Tabla 24. Optimización de respuesta Para las condiciones de operación (Relación-Temperatura) con respecto a los porcentajes de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) “Pureza Media”.

Variable	Valor de optimización			Variable	Valor de optimización		
Temperatura	65,70			Temperatura	66		
Relación	2,38			Relación	2,67		

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%
SOS	14,58	2,53	(8,59; 20,57)	SOS	11,55	2,95	(4,56; 18,54)
POS	25,88	1,90	(21,40; 30,36)	POS	30,59	2,21	(25,36; 35,82)
POP	16,94	1,73	(12,85; 21,03)	POP	19,99	2,02	(15,22; 24,77)

En la tabla 24 se especifican valores ajustados para el modelo analizado, Cuando hay un conjunto de datos con valores dispersos, como los que se obtiene en este modelo estadístico, por ejemplo valores de SOS mínimos de 0,46 y máximos 22 el modelo no se ajusta a los valores objetivos proporcionados al programa para el triglicérido SOS, el cual tiene valores mínimo (25%) y valor máximo (30%) debido a este suceso, los valores que se indica en la tabla son valores mínimos de 14,58 y máximos de 11,55; indicando que no se ajustan en un 100% a los valores objetivos.

Gracias a la optimización realizada a este primer diseño experimental (“pureza media”) se determinó que las mejores condiciones de operación para llegar a obtener un CBE son: Temperatura (65,70°C - 66°C) y Relación (1:2,38 – 1:2,67), con una probabilidad significativa de obtener composiciones similares a las de la manteca de cacao en dos de los triglicéridos de interés (POP y POS); con respecto al TAG SOS la obtención de una composición similar a la manteca de cacao no es segura ya que el modelo no se ajusta para este triglicérido.

Los rangos de composición de cada triglicérido se realizaron utilizando las ecuaciones 1,2 y 3 remplazando la temperatura y relación optimas halladas con los valores mínimos y máximos de cada TAG (Tabla 25), estos rangos son: POP (21,47– 24,5) %; POS (22,59 – 32,26) %, SOS (15,14 – 18,08) %.

3.5 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA PARTE DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS (Ácido esteárico “Pureza Alta”)

Gracias a las gráficas obtenidas en los primeros 8 experimentos de la primera parte del diseño experimental descritas a partir del numeral 3.4.1 se logra determinar que el mejor tiempo de reacción es la cuarta hora ya que los

porcentajes de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) muestran un comportamiento similar a los de la manteca de cacao esto con respecto a las demás horas de reacción, con lo cual en esta segunda parte del diseño experimental se decide analizar el perfil de triglicéridos de cada experimento únicamente en la cuarta hora de reacción (**Ver ANEXO E**).

Con los porcentajes de triglicéridos obtenidos en la cuarta hora de reacción se decide realizar el análisis de varianza con ayuda del software Minitab 18 para los tres principales TAG's (POP, POS y SOS), también se realiza el análisis de las gráficas de superficie respuesta y de contorno con el fin de determinar el efecto que tienen las variables del diseño experimental en cada uno de estos triglicéridos.

Tabla 25. Porcentaje de los TAG's de interés en la cuarta hora de reacción para los experimentos realizados con ácido esteárico "Pureza Alta"

Análisis	POP	POS	SOS
E1	11,99	38,02	15,95
E2	14,86	26,76	30,54
E3	13,82	19,64	26,34
E4	5,07	25,96	52,72
E5	10,34	38,88	15,22
E6	7,54	32,38	38,82
E7	7,61	15,98	53,98
E8	6,51	13,27	28,6
E9	13,2	27,99	20,33
E10	3,56	31,29	31,34
E11	10,7	39,73	14,48

3.5.1 Análisis de varianza para el triglicérido POP. El análisis estadístico ANOVA para la superficie de respuesta del triglicérido POP, mostró que: La variable de **temperatura** no tiene ningún efecto en el modelo analizado porque el valor p fue mayor a 0,05. Por otro lado, la variable de **Relación** tanto (lineal como cuadrático) son significativas porque, el valor p fue menor de 0,05 indicando que este término tiene un efecto en cuanto al TAG POP.

Tabla 26. Análisis de varianza TAG POP. Diseño con ácido esteárico "Pureza Alta"

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	123,653	24,7306	7,12	0,011
Lineal	45,169	22,5847	6,50	0,025
Temperatura	18,352	18,3524	5,28	0,055
Relación	26,817	26,8170	7,72	0,027
Cuadrado	66,809	33,4044	9,62	0,010
Temperatura*Temperatura	3,248	3,2479	0,93	0,366
Relación*Relación	64,930	64,9297	18,69	0,003
Interacción de 2 factores	11,674	11,6744	3,36	0,109
Temperatura*Relación	11,674	11,6744	3,36	0,109
Error	24,319	3,4741		
Falta de ajuste	23,482	7,8274	37,43	0,002
Error puro	0,836	0,2091		
Total	147,971			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

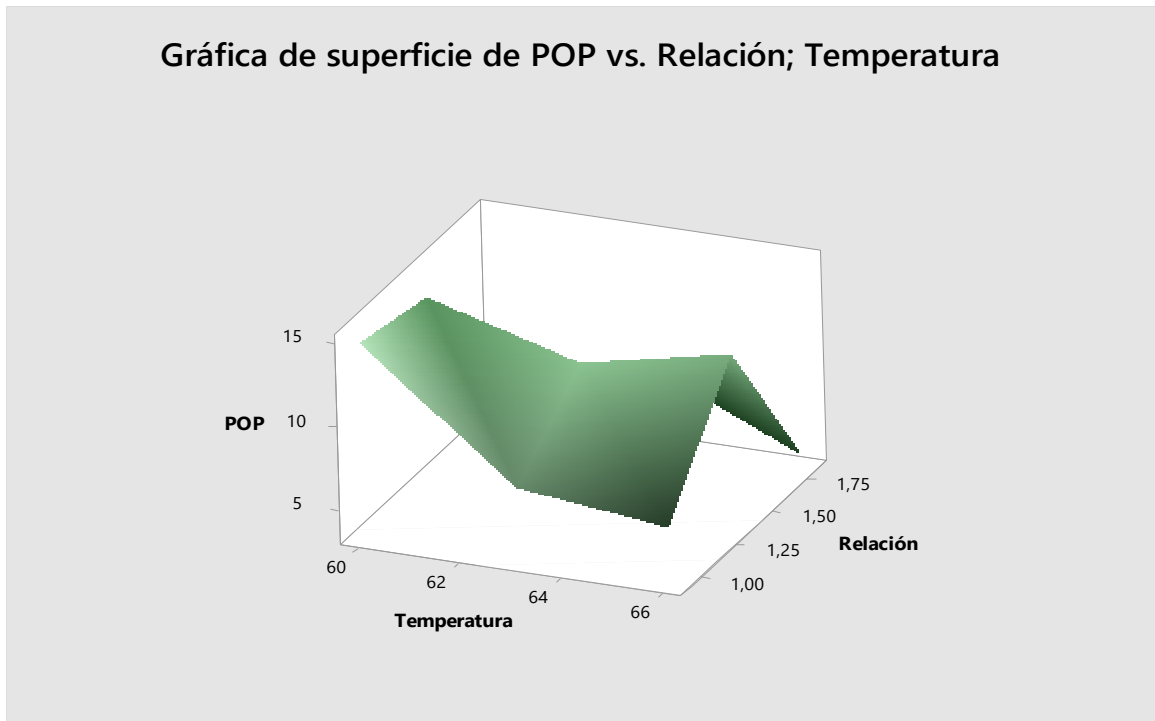
La ecuación cuadrática con el mejor ajuste encontrado para el triglicérido POP es:

Ecuación 4. Triglicérido POP Ácido esteárico "Pureza Alta"

$$\text{POP} = 597 - 17,5 \text{ Temperatura} - 19,8 \text{ Relación} + 0,120 \text{ Temperatura*Temperatura} - 22,91 \text{ Relación*Relación} + 1,238 \text{ Temperatura*Relación}$$

El valor de R^2 fue de 0.8357, el valor de " R^2 Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.7183, además el valor p del modelo es menor de 0,05 lo cual indica que el modelo se ajusta.

Gráfica 33. Superficie de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”

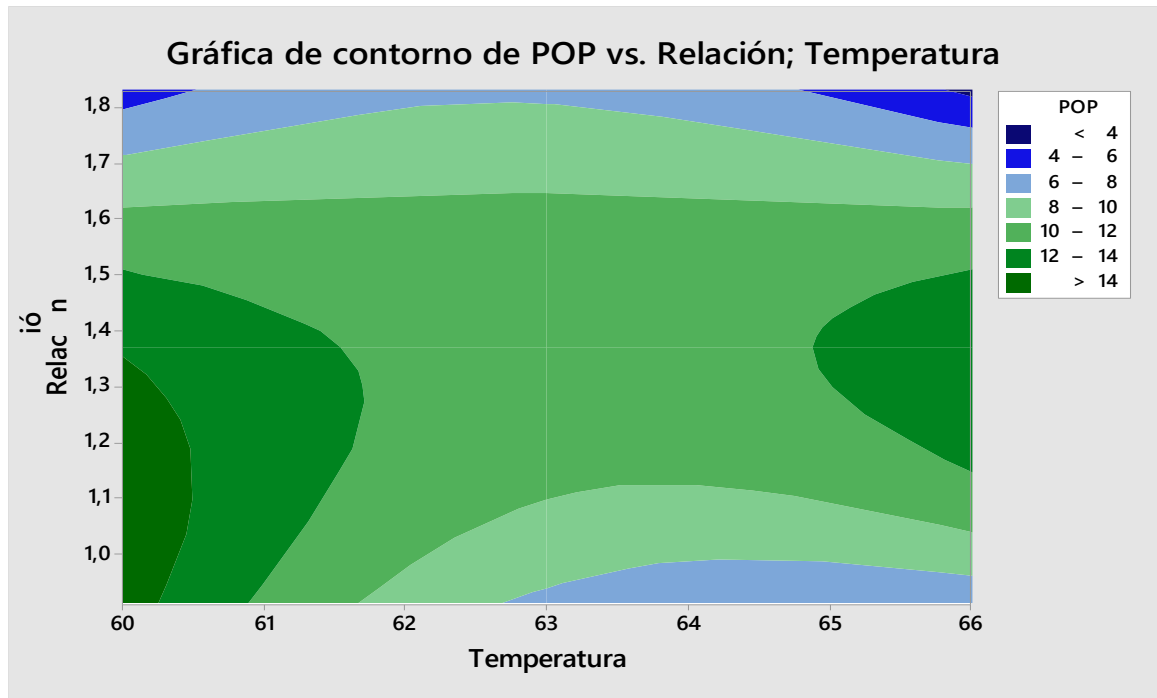


Fuente. Minitab 18 Statistical software

Las gráficas de superficie y contorno muestran el efecto que tienen las variables (Temperatura – Relación) con respecto a la variable respuesta (POP). Por ejemplo, si la temperatura y relación escogidas son el nivel alto (T:66°C y R:1:1,83) la composición del triglicérido POP se ve afectada llegando a un valor de 3,56% (declinación más notoria en la gráfica) por lo cual se debe evitar esta interacción con el fin de obtener mejores resultados. Por otro lado, al utilizar el nivel alto escogido para la temperatura (T:66°C) y el nivel medio de la relación (R: 1:1,37) la composición del triglicérido de interés POP aumenta hasta un valor de 13,2% (segundo pico más significativo de la gráfica). Se debe evitar escoger una relación de nivel alto (R: 1:1,83) ya que no es la adecuada para la composición del triglicérido de interés POP.

Con el fin de lograr una composición similar a la manteca de cacao (15% - 20%) respecto al triglicérido de interés POP la mejor opción de temperatura y relación son: T:60°C y R: 1: 0,91 (pico más significativo de la gráfica).

Gráfica 34. Contorno de POP vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.5.2 Análisis de varianza para el Triglicérido POS

Tabla 27. Análisis de varianza TAG POS. Diseño con ácido esteárico “Pureza Alta”

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	362,649	72,530	1,42	0,325
Lineal	92,838	46,419	0,91	0,447
Temperatura	49,244	49,244	0,96	0,359
Relación	43,594	43,594	0,85	0,387
Cuadrado	268,978	134,489	2,63	0,141
Temperatura*Temperatura	88,850	88,850	1,73	0,229
Relación*Relación	77,762	77,762	1,52	0,258
Interacción de 2 factores	0,832	0,832	0,02	0,902
Temperatura*Relación	0,832	0,832	0,02	0,902
Error	358,489	51,213		
Falta de ajuste	357,036	119,012	327,75	0,000
Error puro	1,452	0,363		
Total	721,138			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

El análisis estadístico ANOVA para la superficie de respuesta del triglicérido POS, mostro que: Las variables de **temperatura y relación** no tienen ningún efecto en el modelo analizado porque el valor p fue mayor a 0,05 indicando que el modelo no se ajusta con respecto a la variable respuesta (POS).

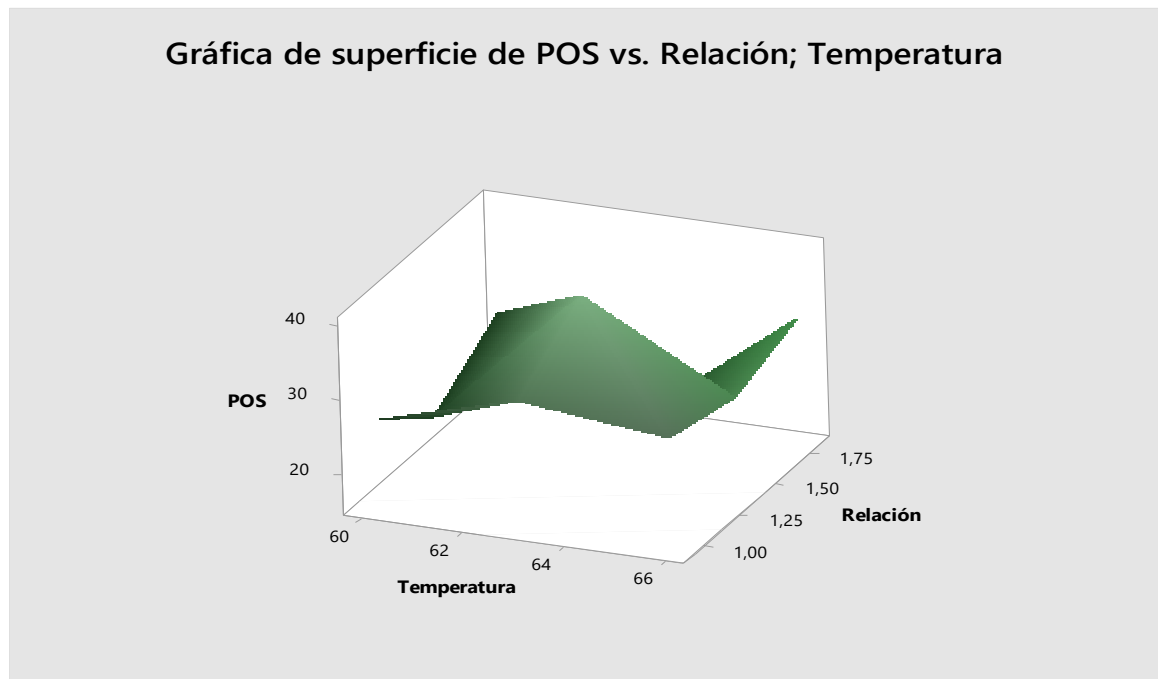
La ecuación cuadrática con el mejor ajuste encontrada para el triglicérido POS es:

Ecuación 5. Triglicérido POS Ácido esteárico "Pureza Alta"

$$\text{POS} = -2536 + 79,9 \text{ Temperatura} + 42 \text{ Relación} - 0,630 \text{ Temperatura*Temperatura} - 25,1 \text{ Relación*Relación} + 0,33 \text{ Temperatura*Relación}$$

El valor de R^2 fue de 0.5029, el valor de " R^2 Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.1478, además el valor p del modelo es mayor a 0,05 indicando que el modelo no se ajusta para el triglicérido POS.

Gráfica 35.Superficie de POS vs relación y temperatura. Acido "Pureza Alta"



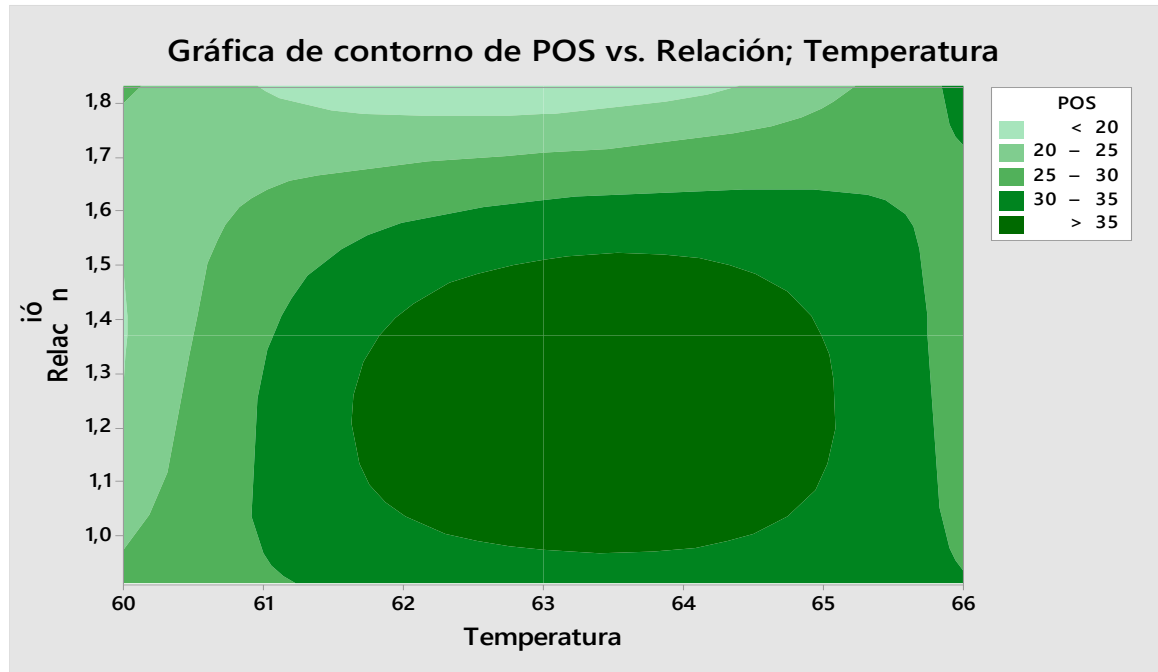
Fuente. Minitab 18 Statistical software

Gracias a las gráficas 35 y 36 se puede observar el efecto que tienen las variables (Temperatura – Relación) con respecto a la variable respuesta (POS). Por ejemplo, si la temperatura escogida es (T: 63°C) y relación escogida es el nivel alto (R:1:1,83) la composición del Triglicérido POS es la más baja con un valor de 13,27% (declinación más notoria en la gráfica) lo cual hace que no cumpla con las características de un CBE. Por el contrario, al utilizar el nivel medio de la relación y

la temperatura (R :1:1,37 y T: 63°C) la composición del triglicérido POS aumenta a un valor de 39,73% el cual es el pico más significativo de la gráfica.

Para lograr una composición similar a la manteca de cacao (30% - 35%) respecto al triglicérido de interés POS la mejor opción de temperatura y relación son: T:63°C y R: 1:0,91 logrando una composición de 32,38% (segundo pico más significativo de la gráfica)

Gráfica 36. Contorno de POS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.5.3 Análisis de varianza del Triglicérido SOS. El análisis estadístico ANOVA para la superficie de respuesta del triglicérido SOS, mostro que: La variable de **temperatura** no tiene ningún efecto en el modelo analizado porque el valor p fue mayor a 0,05. Por otro lado, la variable de **Relación** tanto (lineal como cuadrático) son significativas porque, el valor p fue menor de 0,05 indicando que este término tiene un efecto en cuanto al TAG SOS.

Tabla 28. Análisis de varianza TAG SOS. Diseño con ácido esteárico "Pureza Alta".

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2042,90	408,58	11,18	0,003
Lineal	411,06	205,53	5,62	0,035
Temperatura	143,33	143,33	3,92	0,088
Relación	267,73	267,73	7,33	0,030
Cuadrado	1537,29	768,64	21,03	0,001
Temperatura*Temperatura	2,33	2,33	0,06	0,808
Relación*Relación	1354,68	1354,68	37,07	0,000
Interacción de 2 factores	94,55	94,55	2,59	0,152
Temperatura*Relación	94,55	94,55	2,59	0,152
Error	255,79	36,54		
Falta de ajuste	254,70	84,90	311,81	0,000
Error puro	1,09	0,27		
Total	2298,70			

Fuente. Minitab 18 Statistical software

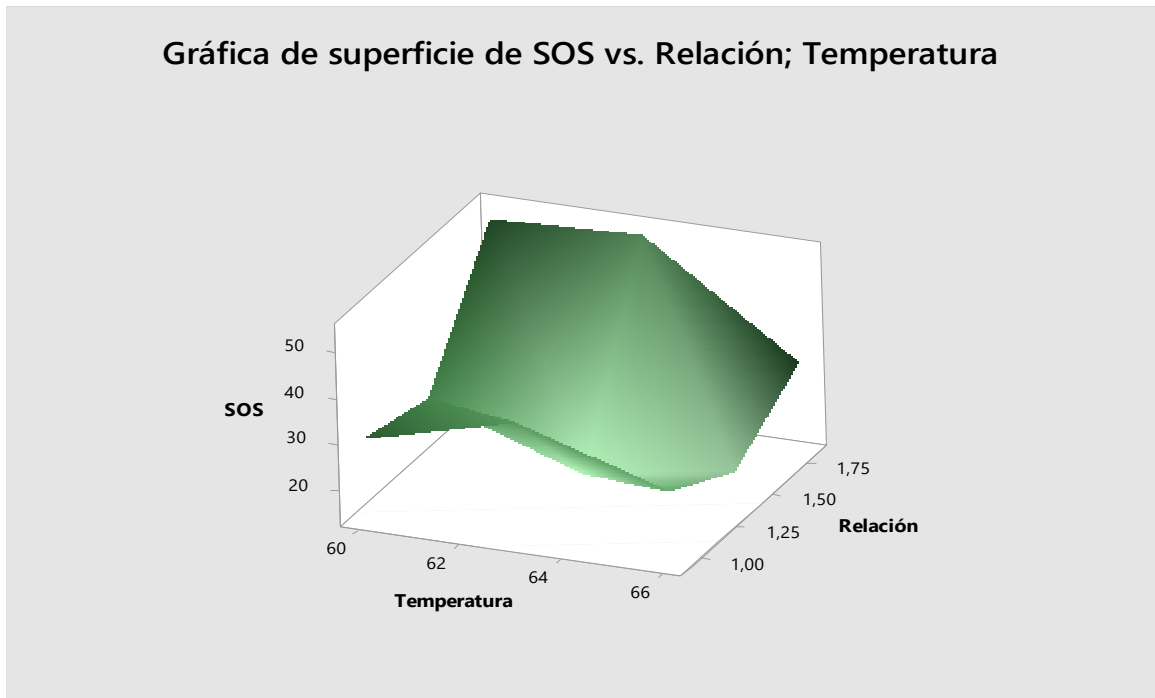
La ecuación cuadrática con el mejor ajuste encontrada para el triglicérido SOS es:

Ecuación 6. Triglicérido SOS Ácido esteárico "Pureza Alta"

$$\text{SOS} = -412 + 16,1 \text{ Temperatura} - 50 \text{ Relación} - 0,102 \text{ Temperatura*Temperatura} + 104,7 \text{ Relación*Relación} - 3,52 \text{ Temperatura*Relación}$$

El valor de R^2 fue de 0.8887, el valor de " R^2 Adj" (Regresión cuadrada ajustable) es de 0.8087, además el valor p del modelo es menor a 0,05 indicando que el modelo se ajusta para la variable respuesta SOS.

Gráfica 37. Superficie de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”

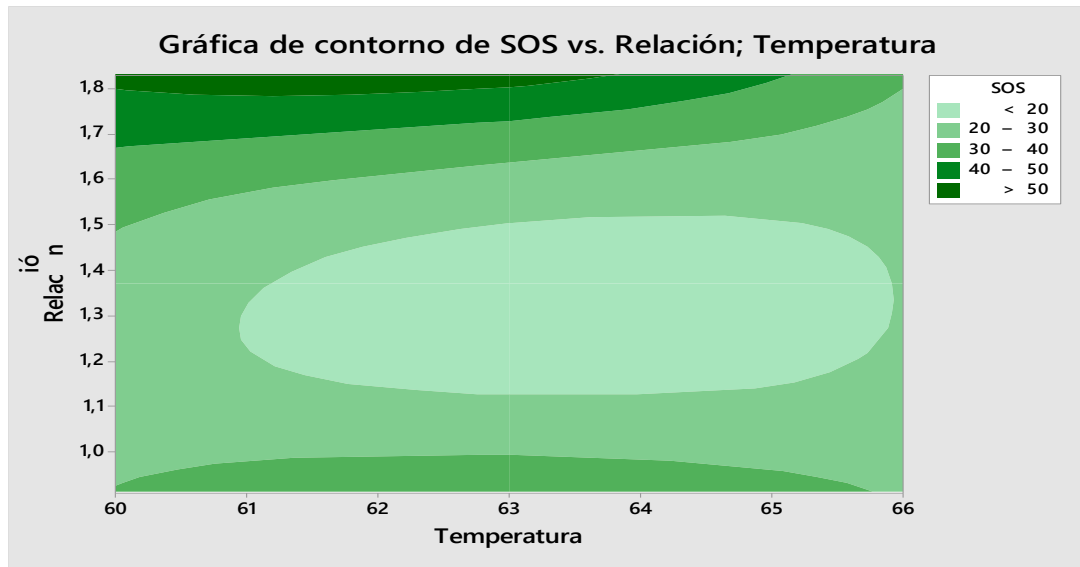


Fuente. Minitab 18 Statistical software

Las gráficas de superficie y contorno muestran el efecto que tienen las variables (Temperatura – Relación) con respecto a la variable respuesta (SOS). Por ejemplo, si la temperatura escogida es (T: 63°C) y relación escogida es el nivel alto (R:1:1,83) la composición del Triglicérido SOS aumenta a un valor máximo de 53,98% (pico más significativo en la gráfica) lo cual hace que no cumpla con las características de un CBE porque el valor de este triglicérido es mayor que la composición requerida por una manteca de cacao (25% - 30%). Por el contrario, al utilizar el nivel medio de la relación y la temperatura (R :1:1,37 y T: 63°C) la composición del triglicérido SOS disminuye a un valor de 14,48% el cual es la declinación más notoria de la gráfica.

Para lograr una composición similar a la manteca de cacao (25% - 30%) respecto al triglicérido de interés SOS la mejor opción de temperatura y relación son: T:60°C (nivel bajo) y R: 1:1,37(nivel medio) logrando una composición de 26,34%.

Gráfica 38. Contorno de SOS vs relación y temperatura. Acido “pureza Alta”



Fuente. Minitab 18 Statistical software

3.5.4 Análisis de predicción y optima respuesta para el diseño experimental con ácido esteárico de “Pureza Alta”. Con la ayuda del software Minitab 18 se obtuvieron los datos de predicción y optimización para este diseño experimental, con el fin de mostrar los errores de predicción de cada modelo y dejar en evidencia cuál de ellos no se ajusta al diseño; así como, los resultados de la optimización bajo la premisa que dos de las tres ecuaciones se ajustan al modelo del diseño con ácido esteárico de “Pureza Alta”, con el fin de determinar las mejores condiciones de operación (Relación – Temperatura) para obtener los porcentajes de los triglicéridos de interés con mayor similitud a los de una manteca de cacao los cuales están entre los siguientes rangos: POP (15% -20%); POS (30%-35%) ; SOS (25% - 30%).

Tabla 29. Datos de predicción para los triglicéridos de interés. Diseño de experimentos con ácido de “Pureza Alta”

POP	POP Predicción	Error estándar de ajuste pronosticado (POP)	POS	POS Predicción	Error estándar de ajuste pronosticado	SOS	SOS Predicción	Error estándar de ajuste pronosticado
14,9	13,5	1,7	26,8	25,5	6,4	30,5	32,4	5,4
6,5	6,5	1,7	30,3	30,3	6,4	28,6	32,3	5,4
5,1	5,8	1,7	26,0	19,2	6,4	52,7	55,5	5,4
3,6	5,7	1,7	31,3	25,8	6,4	31,3	36,0	5,4
13,8	14,5	1,3	19,6	27,7	5,0	26,3	21,8	4,2
13,2	11,0	1,3	28,0	33,4	5,0	20,3	12,0	4,2
7,5	8,9	1,3	32,4	33,6	5,0	38,8	33,3	4,2
7,6	4,7	1,3	16,0	28,2	5,0	54,0	46,6	4,2
12,0	11,7	0,8	38,0	36,2	3,0	16,0	17,8	2,5
10,7	11,7	0,8	39,7	36,2	3,0	14,5	17,8	2,5
11,3	11,7	0,8	38,9	36,2	3,0	15,2	17,8	2,5
11,3	11,7	0,8	38,9	36,2	3,0	15,2	17,8	2,5
11,3	11,7	0,8	38,9	36,2	3,0	15,2	17,8	2,5

En la tabla 29 se muestran los errores estándar de ajuste pronosticado de cada uno de los modelos analizados en este diseño experimental, con lo cual se indica que el modelo para el triglicérido POS no se ajusta al diseño ya que los errores estándar de ajuste pronosticado son altos en comparación a los otros dos modelos, además en el análisis de varianza el valor p para este modelo es mayor a 0,05 indicando que no se puede ajustar a este diseño experimental realizado con ácido esteárico de “Pureza Alta”.

La tabla 30 se realizó utilizando los valores mínimo y máximo de composición de cada uno de los triglicéridos de interés de una manteca de cacao. POP valor mínimo (15%) y valor máximo (20%); POS valor mínimo (30%) y valor máximo (35%); SOS valor mínimo (25%) y valor máximo (30%) con el fin de determinar el rango de las condiciones de operación (Relación – Temperatura).

Tabla 30. Optimización de respuesta Para las condiciones de operación (Relación-Temperatura) con respecto a los porcentajes de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) “Pureza Alta”

Variable		Valor de optimización		Variable		Valor de optimización	
Temperatura		60,67		Temperatura		61,49	
Relación		1,04		Relación		0,95	

Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%
SOS	25,00	3,57	(16,57; 33,43)	SOS	30,00	3,79	(21,04; 38,96)
POS	30,00	4,22	(20,02; 39,98)	POS	31,61	4,49	(21,00; 42,21)
POP	13,62	1,10	(11,02; 16,22)	POP	11,50	1,17	(8,74; 14,27)

En la tabla 30 se especifican valores ajustados para el modelo analizado, Cuando hay un conjunto de datos con valores dispersos, como los que se obtiene en este modelo estadístico, por ejemplo valores de POP mínimos de 5 y máximos 15, el modelo no se ajusta a los valores objetivos proporcionados al programa para el triglicérido POP, el cual tiene valores mínimo (15%) y máximo (20%); debido a este suceso, los valores que se indica en la tabla para POP son valores mínimos de 13,62 y máximos de 11,50, indicando que no se ajustan en un 100% a los valores objetivos.

Gracias a la optimización realizada a este segundo diseño experimental (“Pureza Alta”) se determinó que las mejores condiciones de operación para llegar a obtener un CBE son: Temperatura (60,67 °C – 61,49 °C) y Relación (1:0,95 – 1:1,04) , con una probabilidad significativa de obtener composiciones similares a las de la manteca de cacao en dos de los triglicéridos de interés (POP y SOS); con

respecto al TAG POS la obtención de una composición similar a la manteca de cacao no es segura ya que el modelo no se ajusta para este triglicérido.

Los rangos de composición de cada triglicérido se determinaron utilizando las ecuaciones 4,5 y 6 reemplazando la temperatura y relación óptimas halladas con los valores mínimos y máximos de cada TAG (Tabla 30), estos rangos son: POP (8,5 -10,8) %; POS (29,95 – 31,53) %, SOS (28,48 – 33,69) %.

Los diseños de experimentos efectuados permitieron la evaluación de las condiciones de operación propuestas en el capítulo anterior; el análisis realizado para los primeros ocho experimentos en todo el tiempo de reacción para el diseño con ácido esteárico de “pureza media” proporcionó un indicio sobre la mejor hora en la que se observa una semejanza en los triglicéridos de interés (POS, POP, SOS) a la manteca de cacao, la mejor hora fue la hora cuarta, con la cual se justifica el análisis cromatográfico efectuado en el diseño de experimentos.

Al desarrollar el diseño de experimentos con el ácido esteárico de pureza alta, el triglicérido SOS tiene valores más altos en su composición que el triglicérido en el diseño de experimentos realizado con ácido esteárico de pureza media; confirmando que un ácido esteárico más puro, genera una mezcla con aumento en el triglicérido mencionado (SOS), del cual el porcentaje es nulo al inicio de la reacción y se busca que al finalizar el tiempo de reacción tenga resultados puntuales altos, semejantes a la manteca de cacao, al igual que el ácido esteárico, hay diferentes materias primas que pueden ser usadas en reemplazo; (estearato de metilo) especificada en la patente 2.1.2.3, (el aceite de soya) mencionada en el artículo con numeral 2.1.1.7 y el aceite de Nuez de mango nombrado en la patente con numeral 2.1.2.1, materias primas que obtienen resultados favorables para el crecimiento de los triglicéridos de interés (POS, POP, SOS) pero que a diferencia del ácido esteárico, tienen una gran dificultad para consecución en Colombia y tiempos prolongados para importación, por lo cual se descartó el uso de estas en el proyecto de investigación.

La temperatura para los dos diseños de experimentos no fue significativa en los rangos evaluados (60 a 66°C), lo cual hace que al escoger un ácido esteárico de pureza alta o uno de pureza media, no se convierta en la variable determinante para obtener una composición en los triglicéridos (POS, POP y SOS) semejante a la manteca de cacao. En la patente “Method for continuously preparing cocoa butter equivalent” especificada en el numeral 2.1.2.3; se realiza un tratamiento a las materias primas antes de colocarla en contacto con la enzima, en donde se les aumenta la temperatura hasta los 28°C y después se procede a tomar una medición cada 10 minutos durante el tiempo de reacción, con este pre tratamiento de las materias primas, la temperatura de reacción disminuye hasta 55°C haciendo que la variable de Temperatura sea más significativa para la investigación realizada en la patente y se tengan datos similares a la manteca de cacao en los porcentajes de los triglicéridos de interés.

Se logró por medio de los análisis estadísticos, obtener las condiciones de operación durante los dos diseños experimentales para cada uno de los triglicéridos de interés (POP, POS, SOS), permitiendo una aproximación en cada valor de las variables (Temperatura - Relación) para la obtención del Equivalente a la Manteca de Cacao en la empresa SIGRA S.A. Las condiciones y el comportamiento para cada uno de los triglicéridos se describen porcentualmente:

En el caso del triglicérido POP, tanto para el primer diseño de experimentos como para el segundo diseño fue el que tuvo un ajuste de modelo significativo; 0,005 y 0,011 respectivamente debido a que el valor $p < \alpha$, siendo $\alpha = 0,05$. La relación entre los dos diseños estuvo en la variable de relación (Cuadrática), indicando que, al manipular las variables de temperatura y relación en el modelo, es más significativo la variable de relación y se predice mejor la obtención del triglicérido POP.

Para el triglicérido POS, hay un ajuste del modelo en el valor p de 0,007 para el primer diseño de experimentos realizado con ácido esteárico de pureza media; para el de pureza alta, no se ajusta el modelo, teniendo un valor p de 0,325. La sinergia para el primer diseño ocurre en la interacción de las variables (Temperatura-relación); indicando que al operar las dos variables se puede predecir mejor la obtención del triglicérido POS. Para el segundo diseño no hay una relación significativa ni lineal, ni cuadrática ni en la interacción de ninguna de las variables.

Para el triglicérido SOS, hay un ajuste del modelo en el valor p de 0,003 para el primer diseño de experimentos realizado con ácido esteárico de pureza media; para el de pureza alta, no se ajusta el modelo, teniendo un valor p de 0,06; aunque es relativamente cerca al valor p del ajuste del modelo. La variable más significativa en los dos diseños experimentales fue la relación (Cuadrática), indicando que al cambiar los rangos de la variable de relación se puede predecir mejor la obtención del triglicérido SOS.

Otra de las variables que pueden tener un efecto significativo durante el proyecto de investigación es la cantidad enzima utilizada. La Tesis especificada en el numeral 2.1.3.3 "Obtención de lípidos estructurados a escala semi-industrial mediante transesterificación con lipasa estereoespecíficas inmovilizadas" evaluó la síntesis de una mezcla grasa mediante dos enzimas inmovilizadas diferentes, la lipasa de "*Thermomyces lanuginosa*" y "*Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei*", Determinando que un porcentaje mayor del 10% de la masa total de sustratos produce mayor rendimiento y productividad para una interesterificación enzimática de CBE con la enzima "*Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei*".

4. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MEZCLA GRASA DE REACCIÓN Y LA MANTECA DE CACAO

Para la evaluación de las propiedades físicas y químicas de la mezcla grasa de reacción y la manteca de cacao, se realizan los análisis a nivel laboratorio de las muestras obtenidas desde la hora 0 hasta la hora 5 de reacción por cada experimento.

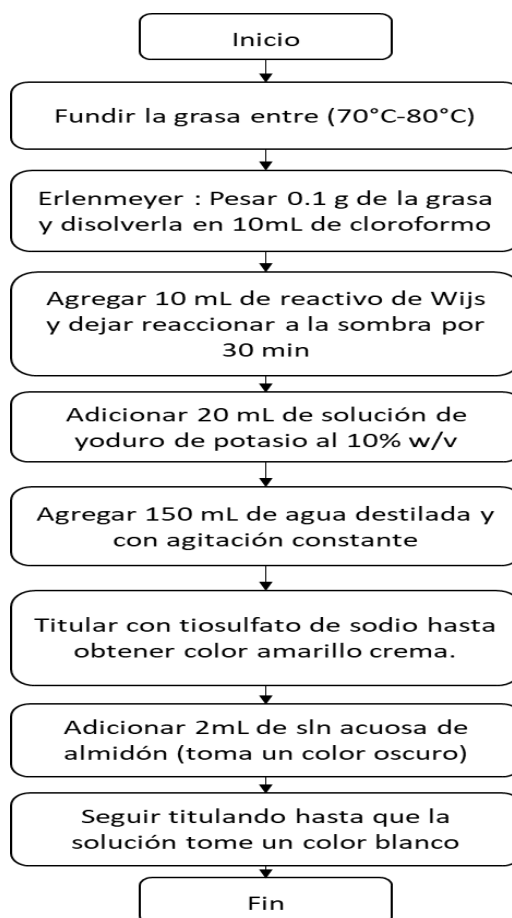
Se especifica la descripción de cada procedimiento, los reactivos empleados y el propósito que tiene cada uno de los análisis a realizar (índice de yodo, acidez y contenido de grasa sólida) así como los valores obtenidos tanto de la manteca de cacao de referencia y de las muestras de la mezcla grasa en cada experimento.

4.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS REALIZADOS A NIVEL LABORATORIO

Las muestras obtenidas en el diseño de experimentos durante todo el tiempo de reacción (hora cero hasta hora 5) se deben someter a ciertos análisis como lo son, determinación de índice de yodo, determinación de índice de acidez y contenido de grasa sólida la cual solo se realiza a la primera y última muestra tomada durante el tiempo de reacción (hora cero y hora 5). A continuación, se presenta la descripción de los procedimientos que se llevan a cabo a escala laboratorio.

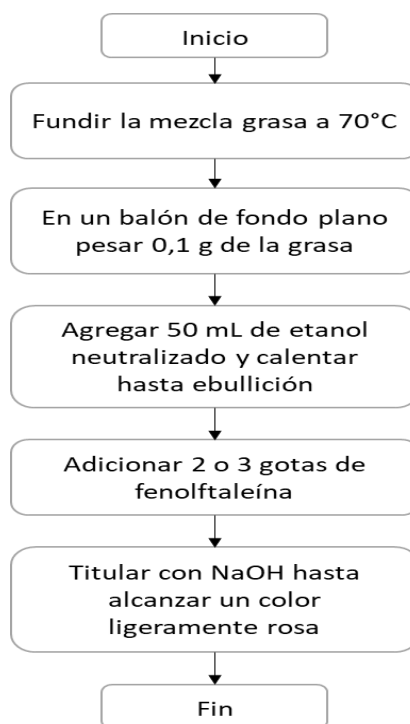
4.1.1 Determinación del índice de yodo. Las muestras son calentadas entre 70°C y 80°C con el fin de eliminar los cristales que puedan estar presentes en la mezcla grasa, posterior a este procedimiento en un Erlenmeyer se pesa 0,1 g de la muestra grasa para poder disolverla en 10 mL de cloroformo, a continuación se agregan 10 mL de reactivo de Wijs y se deja reaccionar a la sombra por 30 minutos (Erlenmeyer tapado), pasado este tiempo se pesan 2 g de yoduro de potasio el cual se disuelve en 20 mL de agua destilada y se agregan a la solución problema, posterior a esto se debe agregar 150 mL de agua destilada y se debe insertar el agitador magnético al Erlenmeyer con el fin de obtener una agitación vigorosa y constante la cual es requerida en los siguientes pasos, se procede a titular con una solución acuosa de tiosulfato de sodio hasta que la solución problema tome un tono amarillo crema con el fin de agregar 2 mL de solución acuosa de almidón al 1% v/v(la solución toma un tono oscuro) con lo que se sigue titulando con la solución acuosa de tiosulfato de sodio hasta que la solución problema tome un color blanco. (se anotan lo mL gastados en la titulación). El diagrama 9 describe el procedimiento realizado. Este método es una escala que se utiliza para medir el grado de insaturaciones que tiene un compuesto (enlaces dobles y triples) y se expresa como los gramos de yodo absorbidos por 100 g de muestra.

Diagrama 9. Procedimiento para determinar el índice de yodo



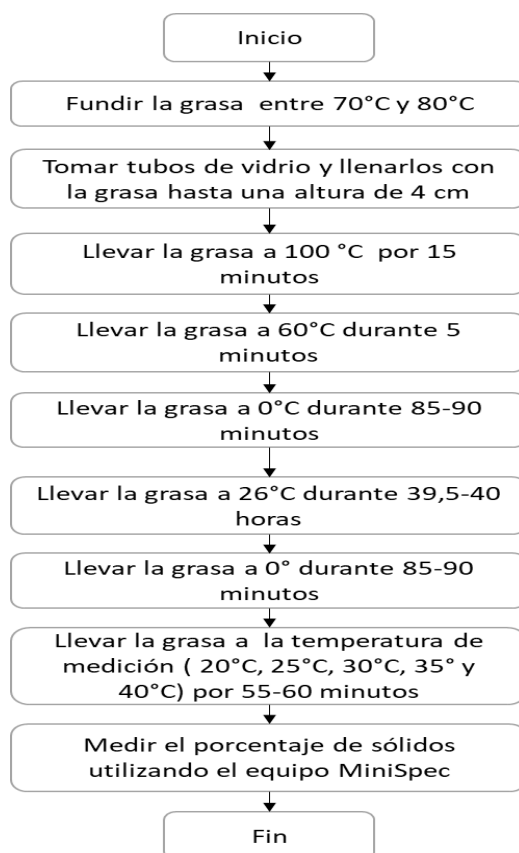
4.1.2 Determinación del índice de acidez. La acidez indica la presencia de ácidos grasos libres (FFA); el procedimiento se describe en el diagrama 10 con lo cual se debe fundir la mezcla grasa a 70°C con el propósito de eliminar los cristales que puedan estar presentes en la grasa y así poder pesar 0,1 g de la mezcla grasa en un balón de fondo plano, a continuación se adicionan 25 mL de etanol neutralizado y se lleva a calentar hasta ebullición finalmente se adicionan 2 o 3 gotas del indicador fenolftaleína y se titula con hidróxido de sodio (NaOH) hasta que la solución tome un color ligeramente rosa que se mantenga estable.

Diagrama 10. Procedimiento para determinar el índice de acidez.



4.1.3 Determinación del contenido de grasa sólida (curva de sólidos). En este procedimiento se describe en el diagrama 11. Inicialmente se calienta la grasa a una temperatura entre 70°C y 80°C se debe agitar vigorosamente con el fin de que se disuelvan los cristales que puedan estar presentes a continuación se toman tubos de vidrio (tubos de MiniSpec) en los cuales se adiciona la grasa a una altura aproximada de 4 cm; en un vaso precipitado se adiciona agua la cual debe llevarse a ebullición con el fin de poner los tubos de vidrio y llevarlos a 100°C aproximadamente por 15 min, posterior a esto se llevan a 60 °C por 5 minutos para después y con ayuda de un baño graduado a 0°C dejar los tubos por 90 min, una vez termina este tiempo se deben secar los tubos y llevarlos a un baño seco graduado a una temperatura de 26°C por 40 horas, pasado este tiempo los tubos se llevan a 0°C por 90 min, por último se dejan a la temperatura a la cual se desea realizar la medición (20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C) por 60 minutos para finalmente hacer la medición utilizando del equipo MiniSpec el cual determina el contenido de sólidos (en porcentaje).

Diagrama 11. Procedimiento para determinar el contenido de grasa sólida.



4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MANTECA DE CACAO

La manteca de cacao de referencia es proporcionada por la empresa SIGRA S.A a la cual se le realizan los análisis de laboratorio descritos en el numeral 4.1 con el fin de determinar sus características físicas y químicas como el contenido de sólidos obtenidos a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C), su índice de acidez y el índice de yodo.

En la tabla 31 se encuentran los valores obtenidos para los análisis de índice de yodo e índice de acidez realizados a nivel laboratorio. Posteriormente la tabla 32 muestra los porcentajes de sólidos obtenidos a las temperaturas mencionadas en el párrafo anterior.

Tabla 31. valores obtenidos a nivel laboratorio para índice de yodo e índice de acidez de la manteca de cacao.

Característica	Valor
Índice de yodo	29,83 g/100g
Índice de acidez	1,031 %

Tabla 32. Contenido de grasa sólida de la manteca de cacao.

Contenido de grasa sólida	
Temperatura (°C)	Valor (%)
N 20	71,191
N 25	66,453
N 30	31,146
N 35	0,842
N 40	0,128

4.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MEZCLA GRASA OBTENIDA DURANTE EL TIEMPO DE REACCIÓN

Sabiendo que se toman seis muestras durante el tiempo de reacción (desde la hora 0 hasta la hora 5) por cada experimento, se realizan los análisis de laboratorio específicamente índice de acidez e índice de yodo a cada una de ellas.

El análisis de contenido de grasa sólida se realiza en dos de las seis muestras por experimento, (hora 0 y hora 5) esto con el fin de observar el comportamiento de la mezcla grasa al comienzo y al final de la reacción.

Con los resultados obtenidos de los análisis de índice de acidez, índice de yodo y contenido de grasa sólida se realiza una comparación de los mejores datos de las muestras obtenidas durante toda la experimentación con respecto a los valores de la manteca de cacao de referencia.

4.3.1 Índice de acidez. Se analizaron 132 muestras con un total de 22 experimentos desarrollados en el diseño experimental, estos están categorizados por el número del experimento seguido de la muestra correspondiente; (1.1,1.2,1.3; 2.1,2.2,2.3... etc) de las cuales se destacan algunos de los mejores resultados con respecto a los de la manteca de cacao **(1,031) %** los cuales se especifican en la tabla 33. Los análisis de índice de acidez de las 132 muestras se ven en el **ANEXO F**.

Tabla 33.Mejores muestras obtenidas con respecto al índice de acidez a nivel laboratorio.

Muestra	%Acidez
1,5	60,00
2,1	59,24
2,3	62,08
2,5	62,30
2,6	57,44
6,1	60,13
6,3	57,26
8,4	58,05
13,1	47,44
13,2	48,93
13,3	49,67
13,4	48,98
13,5	43,89
13,6	47,50
17,2	50,00
19,3	47,95
19,4	48,78
19,6	47,16

Se puede evidenciar que ninguna de las muestras obtenidas tiene una acidez similar a la de la manteca de cacao (**1,031**)% ya que la mezcla grasa obtenida contiene una relación mayor de ácido esteárico que de oleína de palma ,el cual genera que en el medio de reacción hayan más ácidos grasos libres; en los resultados, el grado de acidez tan alto se ve reflejado en la disminución de calidad alimenticia obtenida en la mezcla grasa, por esto, se debe realizar un proceso de desodorización, el cual retira un 85% de acidez en la mezcla; seguido de un fraccionamiento y un proceso de neutralización con el fin de que la acidez descienda y pueda caracterizarse como un CBE.

4.3.2 Índice de yodo. Se analizaron 132 muestras con un total de 22 experimentos desarrollados en el diseño experimental, estos están categorizados por el número del experimento seguido de la muestra correspondiente; (1.1,1.2,1.3; 2.1,2.2,2.3... etc) de las cuales se destacan los mejores resultados con respecto a los de la manteca de cacao (**29,83**) cuales se especifican en la tabla 34. Los análisis de índice de acidez de las 132 muestras se ven en el **ANEXO F**.

Tabla 34. Mejores muestras obtenidas con respecto al índice de yodo a nivel laboratorio.

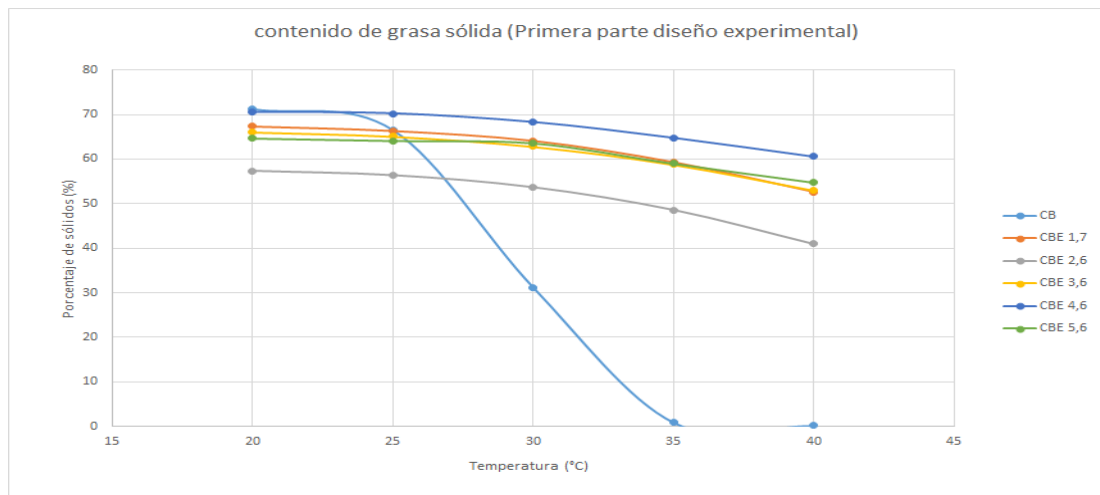
Muestra	Índice de yodo (g/100g)
6,2	23,73
6,4	24,37
8,3	23,78
8,5	23,47
8,6	23,49
12,1	25,94
12,3	28,07
13,1	29,57
16,5	25,34
19,1	25,22
19,6	29,03
22,3	26,75
22,4	26,68
22,5	27,20

El índice de yodo en la mayoría de las muestras es similar al de la manteca de cacao principalmente en la muestra 13,1 pues este valor difiere un 0,26 con respecto al de la manteca de cacao (29,83 g/100g) indicando que la mezcla grasa obtenida durante cada una de las experimentaciones es un potencial CBE ya que sin realizar ningún proceso de fraccionamiento se evidencia que el grado de insaturaciones (enlaces dobles y triples) son cercanos a los de la manteca de cacao de referencia.

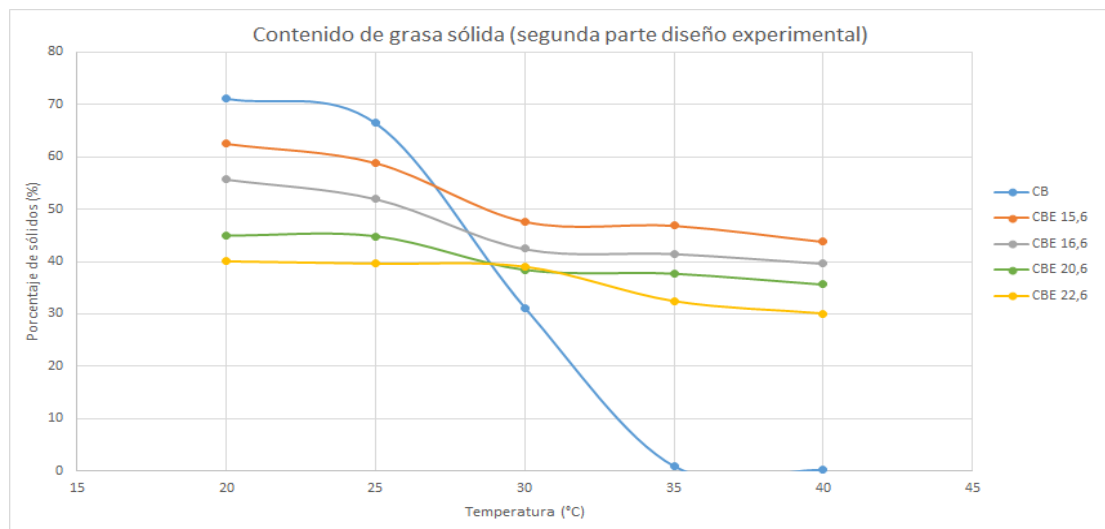
4.3.3 Contenido de grasa sólida. Se analizaron 44 muestras (Ver ANEXO F) con un total de 22 experimentos desarrollados en el diseño experimental; las muestras analizadas corresponden a la hora 0 y a la hora 5 de cada experimento de las cuales se grafican los mejores resultados obtenidos con respecto a los de la manteca de cacao de referencia descritos en la tabla 32.

Se realizan dos gráficas, la primera de ellas muestra los mejores resultados del primer diseño experimental en el cual se empleó el ácido esteárico de “Pureza Media”. En la segunda gráfica se encuentran los mejores resultados obtenidos del segundo diseño de experimentos realizado con el ácido esteárico de “Pureza alta”.

Gráfica 39. Contenido de grasa sólida Primer diseño experimental.



Gráfica 40. Contenido de grasa sólida Segundo diseño experimental



Cómo lo expuesto en las gráficas 39 y 40 anteriormente descritas, el contenido de grasa sólida es diferente en las 5 temperaturas evaluadas a la de la manteca de cacao; la primera gráfica del primer diseño de experimentos se asemeja en el

punto de inicio de la manteca de cacao; la muestra 4.6 es el mejor dato de contenido de grasa sólida para el primer set; la temperatura (N20) muestra una similitud con respecto a la manteca de cacao en un 99,37%. Los siguientes 4 puntos de temperatura (N25, N30, N35 y N40) son diferentes y no presentan una trayectoria igual o semejante a la manteca de cacao.

Para el segundo diseño experimental el contenido de grasa sólida desciende en las temperaturas (N25, N30, N35) reflejando un mejor comportamiento con respecto al primer diseño de experimentos, además al usar un ácido esteárico de "pureza alta" el contenido de grasa sólida de la muestra 15,6 en la temperatura N20 es menor en un 8,68% con respecto a la manteca de cacao. La trayectoria de cada uno de los experimentos descritos en la gráfica 40 se asemejan a la manteca de cacao sin embargo los contenidos de grasa sólida en todos los puntos de temperatura son totalmente diferentes. Se concluye que la mezcla grasa final es un potencial equivalente a la manteca de cacao (CBE); el índice de yodo en la mayoría de las muestras está conforme a lo establecido en la manteca de cacao; estimados en rangos de (23,73 a 29,57) g/100g como lo indica la tabla 34, siendo la mejor muestra el número 13,1 con un valor de 29,57g/100g.

Para el primer diseño experimental hay un acercamiento solo con el primer punto de temperatura (N20), con lo cual se esperaría después de un fraccionamiento, datos cercanos en todos los puntos de temperatura. El contenido de grasa sólida es semejante para el segundo diseño experimental ya que sigue una trayectoria similar a la manteca de cacao con diferentes resultados en los puntos de temperatura (N20, N25, N30, N35, N40), confirmando que un ácido esteárico más puro, genera una mezcla con aumento en los triglicéridos (POS y SOS) de los cuales los porcentajes son bajos al inicio de la reacción y se busca que al finalizar el tiempo de reacción sean más semejantes a la manteca de cacao. En la revisión bibliográfica "Evaluación de la enzima lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales. Del autor Luis Fernando Jácome Reyes" descrita en el numeral 2.1.3.2, se evidencia una curva de sólidos comparando la mezcla grasa obtenida involucrada en un proceso de fraccionamiento, con una manteca de cacao de referencia, la trayectoria es similar, aunque los puntos de temperatura no son iguales a la manteca de cacao; lo cual indica que el resultado para el segundo set experimental de esta investigación es un potencial de CBE, puesto que la mezcla grasa obtenida aún no está fraccionada y su trayectoria de sólidos es similar a la de la manteca de cacao.

Se obtuvieron valores de 60% de acidez como se observa en la tabla 33, debido a que la relación es tres veces mayor de ácido esteárico con respecto a la oleína de palma; un grado de acidez tan alto se ve reflejado en la disminución de calidad alimenticia obtenida en la mezcla grasa, por esto, se debe realizar un proceso de desodorización, el cual retira un 85% de acidez en la mezcla; seguido de un fraccionamiento y un proceso de neutralización con el fin de que la acidez descienda y pueda caracterizarse como un CBE.

5. COSTOS DE PRODUCCIÓN DEL CBE

En este capítulo se desarrollan los costos para la producción de un Equivalente a la Manteca de Cacao (CBE), por lo cual se establecerá un formato con todas las materias primas usadas en cada uno de los experimentos del proyecto (ensayos preliminares y diseños de experimentos), así como el costo de los solventes empleados en cada fraccionamiento a nivel laboratorio en la empresa SIGRA S.A

Los costos de las materias primas empleadas para la producción de la mezcla grasa tienen importancia principalmente en el planteamiento del valor invertido a lo largo del desarrollo de proyecto, con el fin de tener una información real para investigaciones futuras y de esta manera tener una base para escalamiento industrial.

5.1 VALOR DE LA INVERSIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO

La ejecución del proyecto de investigación para la obtención de CBE, se realiza teniendo en cuenta las materias primas que se encuentran en la empresa directamente, las materias primas que se compraron en la ciudad y las que se importaron debido a que no se encontraban en el país. La información evidenciada en la tabla 35, es proporcionada una parte por la empresa SIGRA S.A y obtenida por revisión de facturas de compra.

Los costos del proyecto se dividen en tres secciones: la primera sección específica los costos de producción de los ensayos preliminares los cuales se encuentran descritos en numeral 2.2.4; la segunda sección se refiere a la primera parte del diseño experimental descrito en el numeral 3.3.1 y por último la tercera sección se refiere a los costos de producción de la segunda parte del diseño de experimentos descrito en el numeral 3.3.2.

Tabla 35. Precios de materias primas y solventes cotizados en junio del año 2017.

Materia prima	Cantidad	Precio comercial (COP)
Oleína de palma	1 kg	2.600
Oleína de palma totalmente hidrogenada.	1 kg	3.200
Ácido esteárico "PUREZA BAJA".	1 kg	8.200
Ácido esteárico "PUREZA MEDIA"	1 kg	7.200
Ácido esteárico "PUREZA ALTA"	1kg	456.000
Enzima "Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei"	1 kg	368.200
N – Hexano	1 L	51.300
Acetona	1 L	52.000

5.1.1 Costos de producción de los ensayos preliminares. Como se describe en el numeral 2.2.1 las materias primas utilizadas son oleína de palma totalmente hidrogenada, oleína de palma y ácido esteárico de “PUREZA BAJA”; los costos totales de cada materia prima utilizada en los experimentos preliminares se especifican en la tabla 36.

Tabla 36. Costos de producción de los ensayos preliminares.

Materia prima	Cantidad empleada	Costo total (COP)
Oleína de palma	0,2695 kg	700
Oleína de Palma totalmente hidrogenada	0,2205 kg	700
Ácido esteárico “PUREZA BAJA”.	0,392 kg	3.200
Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei”	0,0294 kg	10.900
TOTAL		15.500

5.1.2 Costos de producción para la primera parte del diseño experimental. Como se describe en el numeral 3.1, las materias primas utilizadas son oleína de palma y ácido esteárico de “PUREZA MEDIA”. Las relaciones utilizadas en el diseño experimental son 1:1.5 ;1:2.25 y 1:3 lo que implica el cambio en la proporción de ácido esteárico utilizado, así como su precio por experimento. En la tabla 37 se especifican los costos totales de cada materia prima empleada en esta parte de la experimentación.

Tabla 37. Costos de producción: primera parte del diseño experimental.

Materia prima	Cantidad empleada	Costo total (COP)
Oleína de palma	1.026 kg	2.700
Ácido esteárico “PUREZA MEDIA”	2.2087 kg	16.000
Enzima “Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei”	0,0294 kg	10.900
TOTAL		29.600

5.1.3. Costos de producción de la segunda parte del diseño experimental. Como se describe en el numeral 3.2, las materias primas utilizadas son oleína de palma y ácido esteárico de “PUREZA MEDIA” y Ácido esteárico de “PUREZA ALTA”. Las relaciones utilizadas en el diseño experimental son 1:0.91 ;1.37 ;1: y 1:1.83 lo que implica el cambio en la proporción de ácido esteárico utilizado,

además los dos ácidos esteáricos se mezclan en una relación 1:0,3 en cada experimento realizado. En la tabla 38 se especifican los costos totales de cada materia prima empleada en esta parte de la experimentación.

Tabla 38. Costos de producción de producción para la segunda parte del diseño experimental.

Materia prima	Cantidad	Costo total (COP)
Oleína de palma	0.94926 kg	2.500
Ácido esteárico "PUREZA MEDIA"	0,289 kg	2.100
Ácido esteárico "PUREZA ALTA"	1kg	456.000
Enzima "Lipozyme IM, Rhizomucor Miehei"	0,020 kg	7.364
TOTAL		468.000

5.1.4. Costos de producción de los análisis de resultados efectuados en el proyecto. Como se describe en el numeral 4.1, donde se exponen los procedimientos efectuados a cada una de las muestras obtenidas en el proyecto, se va a elaborar un costo aproximado del valor incurrido durante el desarrollo de la investigación de acuerdo al valor por muestra que se obtiene en la empresa de los tres tipos de análisis elaborados. En la tabla 39 se especifican los costos totales de cada análisis de laboratorio efectuados durante el desarrollo del proyecto.

Tabla 39. Costos de los análisis de laboratorio.

Tipo de análisis.	Cantidad	Costo por unidad (COP)	Costo total (COP)
Contenido de sólidos (SFC)	132	3.500	462.000
Acidez (%FFA)	132	2.500	330.000
Perfil TAG.	80	5.000	400.000
Índice de Yodo.	132	4.000	528.000
TOTAL			1 720.000

El costo total del proyecto de investigación y desarrollo para la evaluación del proceso para la obtención del CBE fue: **\$ 2 233.100 COP.**

Una vez obtenidos los costos de las materias primas por cada fase del proyecto; (realización de ensayos preliminares, realización de primer y segundo set de diseño experimental), se concluye que el proyecto es factible y viable para futuras investigaciones en cuanto a producción de un Equivalente a la Manteca de Cacao (CBE), en la misma medida que se presente la oportunidad de operar dos laboratorios; el primero para realización de reacciones enzimáticas por medio de un reactor discontinuo y el segundo laboratorio para realización de análisis fisicoquímico de las muestras obtenidas, otorgados por la empresa interesada en la ejecución del proyecto.

6. CONCLUSIONES

- Gracias a los ensayos preliminares se determinaron las variables del proceso de producción del CBE las cuales son: Temperatura (60-66°C), Relación (1:1,5- 1:3) Agitación (400 RPM), porcentaje de enzima (10% peso de los sustratos) y tiempo de reacción (4-5 horas); Así como las mejores materias primas a utilizar (oleína de palma y ácido esteárico) ya que las composiciones de los TAG de interés son más similares a los de una manteca de cacao.
- Se logró por medio de los análisis estadísticos, optimizar las condiciones de operación para los dos diseños experimentales con respecto a la composición de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS) dando como resultado para el diseño con ácido esteárico de “pureza media” un rango óptimo de Temperatura (65,70°C - 66°C) y Relación (1:2,38 – 1:2,67) y para el diseño con ácido esteárico de “Pureza Alta” unos rangos de Temperatura (60,67 °C – 61,49 °C) y Relación (1:0,95 – 1: 1,04) para la obtención del Equivalente a la Manteca de Cacao en la empresa SIGRA S.A.
- Se determinó mediante la evaluación de las propiedades físicas y químicas de la muestra grasa obtenida que el índice de yodo es similar a la manteca de cacao, estimada en rangos de (23,73 a 29,57). El contenido de grasa sólida es semejante para el segundo diseño experimental puesto que sigue una trayectoria similar a la manteca de cacao con diferentes resultados en los puntos de temperatura. La acidez encontrada es alta; debido a que la relación es tres veces mayor de ácido esteárico con respecto a la oleína de palma, se debe hacer la separación de ácidos y el proceso de fraccionamiento para purificación de la mezcla, con el fin de obtener una acidez similar a la de la manteca de cacao.
- El proyecto es factible y viable para futuras investigaciones en cuanto a producción de un Equivalente a la Manteca de Cacao (CBE), en la misma medida que se presente la oportunidad de realizar reacciones y análisis fisicoquímicos en laboratorios otorgados por la empresa directora del proyecto.

7. RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta que el desarrollo del análisis estadístico se hizo con el proceso de reacción enzimática; se esperaría que los valores obtenidos sean más altos y más similares en porcentajes de triglicéridos durante el desarrollo del proceso de separación que se realiza posteriormente. Se debería hacer el análisis estadístico de los datos una vez efectuada la separación para la comparación veraz con la manteca de cacao; no solo en análisis cromatográfico sino en los análisis fisicoquímicos a nivel laboratorio (Índice de yodo, acidez, porcentaje de ácidos grasos), de esa manera, comparar el resultado de la mezcla grasa obtenida con la manteca de cacao y concluir que tan factible es usar el producto obtenido como un CBE.
- Se recomienda realizar la caracterización fisicoquímica (Índice de yodo, Índice de acidez y curva de sólidos) para la mezcla grasa obtenida una vez se realice el proceso de fraccionamiento con el fin de hacer el análisis comparativo con respecto a la manteca de cacao y comprobar si se puede caracterizar como un equivalente a la manteca de cacao (CBE).
- Para futuras investigaciones que requieran el mismo estudio se sugiere trabajar con los rangos de temperatura y relación determinados en la optimización del diseño experimental realizado con ácido esteárico de “pureza alta”. Temperatura (60,67 °C – 61,49 °C) y Relación (1:0,95 – 1: 1,04) ya que las composiciones de los tres triglicéridos de interés se asemejan más a la manteca de cacao.
- De acuerdo a la investigación analizada en el capítulo 2 se sugiere el uso de otras materias primas; por resultados similares en la composición de triglicéridos con respecto a la manteca de cacao, así como análisis estadísticos (superficie respuesta) con porcentajes mayores al 95 % de confiabilidad, se recomienda el estearato de etilo.
- Si se desea seguir adelante con el estudio de producción de un equivalente a la manteca de cacao (CBE) Se recomienda ver el efecto que tiene la acidez del medio de reacción con respecto a la enzima *lipozyme IM, Rhizomucor Miehei* con el fin de saber si afecta la actividad, así como el reordenamiento de los triglicéridos.
- Para futuras investigaciones se recomienda el estudio de otras variables diferentes a la temperatura ya que gracias al análisis estadístico realizado en los dos diseños experimentales y específicamente el realizado con “Ácido esteárico de Pureza Alta” esta no muestra ningún efecto con respecto a cada uno de los triglicéridos de interés (POP, POS y SOS).

BIBLIOGRAFÍA

ALBADER, Kawter. Healthier chocolate profile, consumer demand challenge cocoa butter alternative suppliers. En Editorial Intern. 01 July. 2012.

ARANGO, Luz M y Moreno Nelson, Carlos Pareja, Fernando Martínez, Aidé Perea. Enzymatic Transesterification of Palm Olein for the Production of Special Fats in a Batch Type Reactor, en Revista Palmas, 2004. Vol 25, No especial. Tomo I. Pg. 370 – 375.

BILJANA PAJIN, Aleksandra, Radovan Omorjan. Influence of Soft Cocoa Butter Equivalents on Color and Other Physical Attributes of Chocolate. En Springer Science, 2011.

C.N. Chong, Y.M Hoh, C.W Wang. Fractionation procedures for obtaining Cocoa Butter-Like fat form enzymatically interesterified palm olein. En JAOCS. 1992, Vol 6. N° 2.

Casimir C. Akoh, Oi-Ming Lai, Healthful Lipids, Aocs PRESS, urbana illinions y September 14.

CODINI, Melina; DÍAZ VELEZ Florencia; VILLAVICENCIO, Ines y GHIRARDI, Mariana. Extraction and Applications of Cocoa Butter. En Revista de investigación académica Dialnet. 2004, Pg 143 – 148.

CORTES, Carol y ROJAS, Mónica. Evaluación de la obtención del equivalente de manteca de cacao (Cocoa Butter Equivalent) mediante la reacción enzimática entre oleína de palma y ácido esteárico. Bogotá: Universidad de América. 2016.

CUAMBA GAONA, Raquel. Caracterización de grasas alternativas de la manteca de cacao. México D.F. Tesis (Maestro en Ciencias con especialidad en alimentos). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de graduados.

DE CLERCQ, Nathalie; KADAVIAR, Sheida; DE PELSMAEKER, Sara; GHELLYNCK, Xavier, DEWETTINCK, Koen. Funtionality of cocoa butter equivalents on chocolate products. En Springer, Vol. 243 2017, Pg. 309-321.

DEBASTE, Kkegelaers; S. Liégeois; H. Ben Amor; V. Halloin. Contribution to the modelling of chocolate tempering process. En Journal of food engineering. Vol. 88, no 4, 2008. Pg. 568-575.

GONZÁLEZ, Jorge; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Jairo y DEL MONTE MARTÍNEZ, Alberto Las lipasas enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017].

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta actualización. Bogotá: ICONTEC, 2008.

_____. NTC 5613. Especifica los elementos y su orden en las referencias bibliográficas de las fuentes consultadas para la elaboración de documentos. Última versión. Bogotá: ICONTEC 2008.

_____. NTC 218. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de acidez y acidez. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 29 2017]. disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/37847405/norma-tecnica-ntc-colombiana-218>. [En línea]

_____. NTC 283. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación del índice de yodo. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 29 2017]. Disponible en: <https://documents.tips/documents/ntc-283.html>. [En línea]

_____. NTC 213. Grasas y aceites vegetales y animales. Determinación de punto de fusión (punto de deslizamiento). [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 29 2017]. Disponible en: <https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/NTC213.pdf>. [En línea]

JÁCOME REYES, Luis Fernando. Evaluación de la enzima Lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimática para obtención de grasas especiales. Bucaramanga, 2004. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Cienci.

JENCK S.A. Resonancia Magnética Nuclear de Dominio Temporal. Bruker. Minispec mq-one-SFC. [Electronic (1)]. [consultado el Agosto 29 2017]. Disponible en: <https://www.jenck.com/productos/producto/minispec-mq-one-sfc>. [En línea]

LABBRANDS. Erlenmeyer para vacío (Kitasoto) oliva vidrio-Duran. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 29 2017]. Disponible en: http://www.labbrands.com/erlenmeyer-vacio-vidrio/64-erlenmeyer-para-vacio-kitasato-oliva-vidrio-en-vidrio-duran.html#data_sheet. [En línea]

LOISELA, G; KELLERA, G; LECQB, C y OLLIVONA, M. Phase Transitions and Polymorphism of Cocoa Butter. En *JAOCs* Vol. 75 no. 4, 1998 Pg. 425-439.

MOHAMED Ibrahim. "Lipase-Catalyzed Synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and Saturated Fatty Acid Distillate from Palm Oil Physical Refinery" En *Applied Biochemistry Biotechnology*, (2012) y 1405–1415., Vol. 168 p.

MOHAMED, Ibrahim. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Palm Mid Fraction Oil with palmitic and Stearic Fatty acid Mixture for production of Cocoa Butter Equivalent. En *Springer Science*, 2013 Pg 655-666.

MOHAMED, Ibrahim. Lipase-Catalyzed synthesis of Cocoa Butter Equivalent from Palm Olein and saturated fatty acid Distillate from palm Oil Physical Refinery. En *Springer Science*, 2013 Pg 1405 – 1415.

MONTOYA BUITRAGO, Jhon Javier. Estudio de la formación de BLOOM en el chocolate mediante técnica de difracción de rayos X, Manizales, Universidad Nacional de Colombia, 2003.

MUNKTELL AHLSTROM. Laboratory Filtration Catalog. (Pág. 4). [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.centerquimica.com.ar/productos/ahlstrom-european-lab-catalog-august-2015.pdf>. [En línea]

N.BISWAS, Cheow; C. P, Tan; L. F. Siow. Blending of palm Mid-fraction, refined bleached deodorized palm kernel oil or palm stearin for Cocoa Butter Alternative. En Springer Science, 2016, Pg. 1415-1427.

NISSIM, Garti; WIDLAK, Neil. Cocoa Butter Related Compounds, Aocs Press. Junio, 2012. Pg 14 – 15.

PEREZ LARA, Gisella Alexandra. Mejora en el proceso de temperado del chocolate, Guayaquil, Ecuador. Escuela superior politécnica del Litoral. Pg 27. 2006.

QINGZHE, JIN, JUN, JIN y WANG XINGGUO, Preparation method of Cocoa Butter Equivalent, 2016– 08–10.

ROCKER SCIENTIFIC CO, Ltd. Rocker 600. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.rocker.com.tw/product-3.asp?ser=111>. [En línea]

SAFRA MORENO, Nelson. Obtención de lípidos estructurados a escala semiindustrial mediante transesterificación con lipasa estereoespecíficas inmovilizadas. Bucaramanga, 2008. Trabajo de grado (Doctor Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad.

SERVIBALANZAS. Balanza de precisión marca KERN de Alemania modelo EWB-620-2M. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <http://www.servibalanzas.com/index.php/productos/balanzas/balanza-de-precision-marca-kern-de-alemania-modelo-ewb->. [En línea]

SOEKOPITOJO, S; HARIYADI, P; MUCHTADI, T y ANDARWULAN, N. Enzymatic interesterification of palm oil midfraction blends for the Production of cocoa butter equivalents. J Am Oil Chem Soc. 2010.

SOHEE Kim; HWAN Kim; CASIMIR C Akoh y BYUNG Hee Kim. Enzymatic Production of Cocoa Butter Equivalents High in 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-stearin in Continuous Packed Bed Reactors. J Am Oil Chem Soc. 2014.

TP-LABORATORIO QUÍMICO. Embudo Büchner. [Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 292017]. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo-buchner.html>. [En línea]

UNDURRAGA Daniel ; MARKOVITS, Andrés; ERAZO, Sonia. Cocoa Butter Equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. En ELSEVIER, 2001. Vol. 36 Issue 10. Pg. 933 - 939.

Varian INC. CP-3800 GC Getting Started Manual.[Electronic (1)]. [Consultado el Agosto 29 2017]. Disponible en : <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Varian2200/914647.pdf>. [En línea]

VERÓNIQUE GIBON, Marc Hendrix, CALLIAW Gijs. Adding Value to Palm and Palm Kernel Oils with Fat Modifications. En revista Palma. Vol 37. N° Especial. Pg. 173 – 183. 2016.

WENG XINCHU, WANG SHEINGJIE, ZHUO ZHIYANG. Method for preparing cocoa butter equivalent by aid of 28-degree palm oil médium fractionation substances (POMF). 2016 – 10- 26.

XINCHU, WENG, CHENG, LI y 2015-04-22., SONG NING. Method for preparing cocoa butter equivalent by utilizing palm oil intermediate fractionation product enzymatic transesterfication.

XINCHU, WENG, SHENGJIE, WANG y Z HUO ZHIYANG, Method for continuously preparing cocoa butter equivalent. 2016-10-26.

XUEBING Xu. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark. En: European Journal of Lipid Science and Technology (200f0) p.287-303.

ANEXOS

**ANEXO A
FICHAS TÉCNICAS**



**沈阳东北制药进出口贸易（香港）有限公司
NORTHEAST PHARM. TRADING COMPANY (HK) LTD**

No. 51 the Youth street, Shenhe District, Shenyang, P.R. China Post Code: 110014 FAX: 024-25807955 TEL: 024-25807982

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME: STEARIC ACID Triple Pressed 1842 IN-HOUSE STANDARD
 BATCH NUMBER: 2016.08.08.1 QUANTITY: 12000 KGS
 PACKING: 25 KG/BAG ORIGIN: INDONESIA
 MFG. DATE: 2016-08-08 EXPIRY DATE: 2017-08-08

FIEL COPIA
DEL ORIGINAL

ITEM	SPECIFICATION	TESTING RESULT
Exterior	flakes or Beads	Beads
Colour (Hazen)	≤80	35
Acid Value (mgKOH / g)	207-211	210.40
Saponification Value (mgKOH/g)	208-212	211.50
Iodine Value(g I ₂ / 100g)	≤0.5	0.18
Moisture (%)	≤0.2	0.14
Melting point, °C	53-57	56.5
Fatty acid composition,%		
C12+C14(%)	≤1.5	0.47
C16(%)	52-59	56.79
C18(%)	40-44	42.26
Others %	≤1	0.23
Conclusion	PASS	
ABOVE DATA IS BASED ON THE CERTIFICATE OF ANALYSIS PROVIDED BY THE SUPPLIER / MANUFACTURER OF THIS RAW MATERIAL.		
CONCLUSION: COMPLY WITH REQUIRED STANDARDS		

THE INFORMATION CONTAINED HEREIN IS, TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, CORRECT AND THE STATEMENTS MADE ARE INTENDED ONLY AS A SOURCE OF INFORMATION. NO WARRANTY, EXPRESSED OR IMPLIED, IS MADE OR INTENDED BY THE MANUFACTURER. IT IS SUGGESTED THAT YOU EVALUATE THE PRODUCT ON A LABORATORY SCALE PRIOR TO USE IN A FINISHED PRODUCT. THE MANUFACTURER ASSUMES NO LIABILITY FOR VIOLATION OF PATENT RIGHTS.

PREPARED BY: YANDAN SHI APPROVED BY: XIAOYING CHEN



Product Data Sheet



1 of 2

Valid from 2015-11-27

Novozym® 40086

In this product the key enzyme activity is provided by lipase that hydrolyzes ester bonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTIC SP/PROPERTIES

Component name	Lipase
Activity	275 IUN/g
Color	Brown
Physical form	Immobilized Granulate
Approximate density (g/ml)	0.33
Carriers	Acrylic resin

Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.

PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Interesterification unit IUN	275		/g
Loss on drying	-	5	%
Total viable count	-	50000	/g
Coliform bacteria	-	30	/g
E. coli	Not Detected		/25 g
Salmonella	Not Detected		/25 g
Heavy metals		Max. 30	mg/kg
Lead		Max. 5	mg/kg
Arsenic		Max. 3	mg/kg
Cadmium		Max. 0.5	mg/kg
Mercury		Max. 0.5	mg/kg

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

COMPOSITION

Carriers	Acrylic resin
----------	---------------

ALLERGEN

Allergen	Substance contained ¹	Allergen	Substance contained ²
Celery	no	Molluscs	no
Cereals containing gluten ³	no	Mustard	no
Crustaceans	no	Nuts ⁴	no
Egg	no	Peanuts	no
Fish	no	Sesame	no
Lupin	no	Soy	no
Milk (including lactose)	no	Sulphur dioxide/Sulphites, more than 10 mg per kg or l	no

¹Definition of substances according to EU Regulation 1169/2011, as amended. List covers allergens mentioned in 21 USC 301 (b)(5) and GB 7718-2011 (China).

³i.e. wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut

⁴i.e. almond, hazelnut, walnut, cashew, pecan nut, Brazil nut, pistachio nut, macadamia nut and Queensland nut

GM STATUS

This product is not a GMO.

The enzyme product is manufactured by fermentation of a microorganism that is not present in the final product. The production organism is improved by means of modern biotechnology.

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-10 °C (32-50 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best-before date.

Novozymes guarantees delivery at least 3 months prior to the best-before date.

The product can be transported at ambient temperature. Following delivery, the product should be stored as recommended.

Novozym[®] 40086

SAFETY AND HANDLING PRECAUTIONS

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

COMPLIANCE

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



FOOD SAFETY

Novozymes has carried out a hazard analysis and prepared an HACCP plan describing the critical control points (CCPs). The HACCP plan is supported by a comprehensive prerequisite program implemented in Novozymes' GMP practices.

The product is produced according to Novozymes' HACCP plan, GMP practices, and additional requirements controlled by Novozymes' Quality Management System.

The product complies with FAO/WHO JECFA- and FCC-recommended purity requirements regarding mycotoxins.

The product is produced under FSSC 22000 certification.



PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

Novozymes A/S
Wugphoejvej 36
2880 Bagvaerd
Denmark

Tel: +45 4446 0000
Fax: +45 4446 9999

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S



CERTIFICADO DE ANALISIS

CODIGO: **162590** LOTE: 0000888084PRODUCTO: **Ácido Esteárico, 98% para síntesis**

FECHA DE EMISIÓN: 18/07/2016

FECHA REANÁLISIS: 07/2022

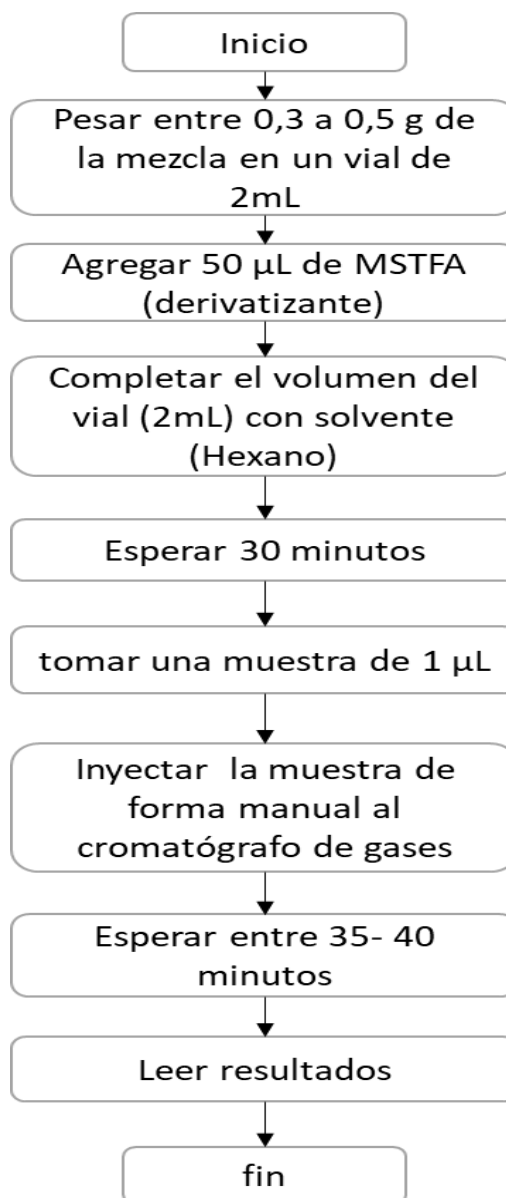
ESPECIFICACIONES	VALOR GARANTIZADO	VALOR REAL
Riqueza mínima (C.G.) (como éster metílico)	98%	98,5%
Identidad	IR conforme ensayo	IR conforme ensayo
Intervalo de fusión	67-70°C	68-69°C

Panreac Química S.L.U.
C/Garraf, 2
Polígono Pla de la Bruguera
E-08211 Castellar del Vallès
(Barcelona) España
Tel. (+34) 937 489 400
Fax (+34) 937 489 401
e-mail: info.es@itwreagents.com
www.itwreagents.com

Quality Assurance Director
Director de Garantía Calidad
P. Verge

CODIGO: **162590** LOTE: 0000888084

ANEXO B
DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES



ANEXO C
PERFIL CROMATOGRÁFICO ÁCIDO ESTEÁRICO (PUREZA MEDIA)

29/06/2017 Cromatograma C:\Clarity Lite\DataFiles\VARIOS\DATA\447 VARIOS Acido estearico Desarrollo muestra uno.PRMágina 1 of 2

C. I. SIGRA S. A.
 GESTION DE CALIDAD
 PERFIL DE ACIDOS GRASOS

Información del cromatograma:

Nombre archivo : C:\Clarity Lite\DataFiles\VARIOS\DATA\447 VARIOS Acido estearico Desarrollo muestra uno.PRM Archivo creado : 29/06/2017 2:00:52 p. m.
 Origen : Adquirida, la adquisición ha comenzado 29/06/2017 1:20:52 p. m. Fecha de adquisición : 29/06/2017 2:00:52 p. m.
 Proyecto : C:\Clarity Lite\DataFiles\Projects\VARIOS.PRJ Por : RICARDO

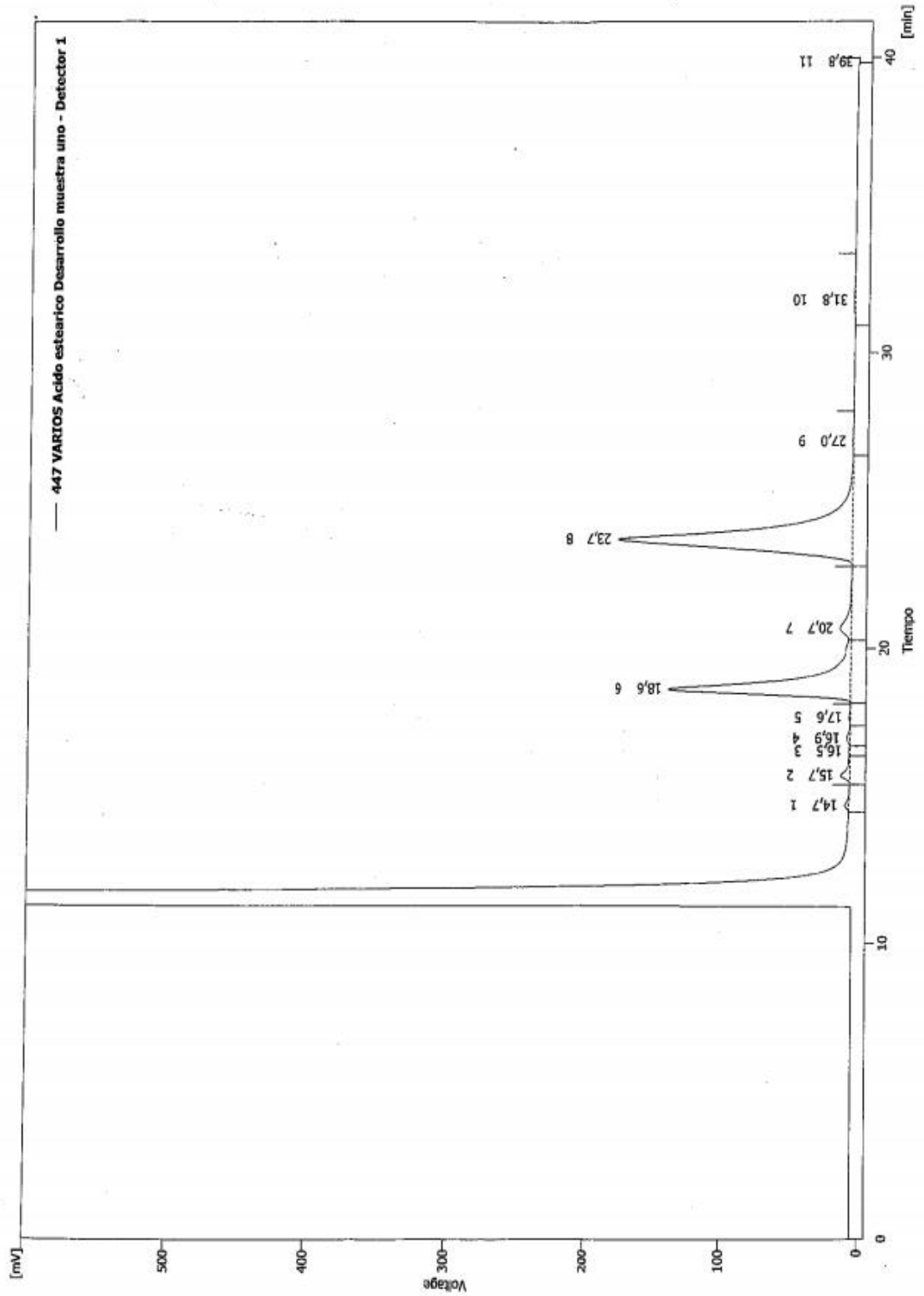
Tabla de resultados (Sin cal. - 447 VARIOS Acido estearico Desarrollo muestra uno - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Altura [mV]	Área [%]	Nombre compuesto
1	14,662	50,500	3,093	0,4	
2	15,686	130,963	6,343	1,1	
3	16,505	12,808	0,761	0,1	
4	16,932	50,431	2,328	0,4	
5	17,541	19,437	0,872	0,2	
6	18,612	4030,192	132,781	32,9	Palmitico
7	20,678	334,076	8,044	2,7	
8	23,682	7525,413	170,866	61,5	Estearico
9	26,998	30,755	0,636	0,3	
10	31,767	58,717	0,901	0,5	
11	39,826	0,977	0,212	0,0	
	Total	12244,269	326,838	100,0	

Método : AC GRASOS Por : Administrator
 Descripción : PERFIL ACIDOS GRASOS
 Creado : 1/12/2016 2:46 a. m. Modificado : 29/06/2017 2:00 p. m.

Columna :
 Fase móvil :
 Flujo :
 Nota :
 Detección :
 Temperatura :
 Presión :

Parada automática : 40,00 min Inicio externo : Sólo inicio, Bajada
 Detector 1 : Detector 1 Intervalo 1 : Bipolar, 1250 mV, 50 Muestras por seg.



ANEXO D
PERFIL DE TRIGLICÉRIDOS ENSAYOS PRELIMINARES
Perfil Triglicéridos Primer Ensayo Preliminar

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	Fraccionamiento		
ANÁLISIS	Resultados					sólido 1	Líquido	Sólido 2
TAG VOLATILES	5,14	8,14	11,36	8,38	9,74	7,32	13,11	10,54
PPP	12,03	9,07	15,37	17,06	17,34	15,22	8,89	24,64
MOP	0,61	1,42	1,32	1,46	1,98	1,18	4,14	0,84
PPS + PSP	36,78	31,32	26,32	28,38	28,14	30,79	4,65	28,65
POP	3,59	3,97	4,21	4,45	4,47	2,79	13,90	3,56
PLP	1,40	1,33	0,91	0,83	1,59	1,25	2,45	0,70
TAG intermedio 1.	0,16	0,95	1,84	0,36	0,48	0,81	0,93	0,30
PSS	26,70	21,67	17,22	18,52	17,90	21,11	1,15	12,88
POS	0,92	8,33	8,13	8,64	7,64	6,00	24,09	7,73
POO	6,90	1,85	1,21	1,38	1,10	1,45	5,00	1,38
PLS	0,00	1,07	1,35	0,59	0,52	0,88	1,89	0,74
PLO	1,29	0,07	0,33	0,00	0,00	0,70	1,31	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SSS	5,32	4,78	3,65	4,26	4,45	5,74	0,00	2,28
SOS	0,00	4,15	5,39	4,52	4,64	3,76	12,42	5,03
SOO	0,00	1,79	1,42	0,86	0,00	0,66	4,43	0,00
SLS+OOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,00
SLO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Perfil Triglicéridos Segundo Ensayo Preliminar

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	Fraccionamiento 1.		Fraccionamiento 2		
ANÁLISIS	Resultados					Líquido	Sólido 2	Sólido 1	Líquido	Sólido 2
TAG VOLATILES	2,18	5,48	3,19	3,00	2,44	2,41	4,74	3,10	2,13	3,20
PPP	0,63	9,23	12,49	13,00	14,71	1,51	23,47	24,71	0,44	5,39
MOP	3,08	2,72	1,34	1,18	1,77	1,80	0,41	0,42	1,69	1,11
PPS + PSP	0,82	10,17	14,11	13,60	18,31	0,72	32,33	34,75	0,00	3,19
POP	25,47	17,38	17,16	16,68	14,94	30,55	5,75	4,66	22,80	24,79
PLP	3,45	5,19	3,45	4,85	2,87	6,39	1,32	0,90	5,83	3,28
TAG intermedio 1.	0,27	0,67	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,68	1,19	1,05
PSS	0,00	3,82	5,16	6,16	7,36	0,00	13,90	15,90	0,00	0,00
POS	7,62	19,45	21,68	20,62	18,99	30,04	8,53	7,51	13,81	34,59
POO	47,09	12,27	9,26	9,08	7,52	10,85	2,68	1,60	30,71	4,03

PLS	0,27	1,55	2,11	1,48	1,30	1,93	0,44	0,34	1,30	1,57
PLO	2,29	1,79	0,33	0,00	0,00	1,38	0,00	0,00	1,99	0,44
Indefinido	0,16	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SSS	0,00	0,34	0,53	0,50	1,00	0,00	1,80	1,77	0,00	0,00
SOS	0,00	6,36	5,97	6,86	5,52	6,70	3,06	2,99	2,96	13,60
SOO	4,92	3,61	2,91	2,94	2,70	4,91	1,27	0,43	14,23	2,79
SLS+OOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,26
SLO	0,94	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,30
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Perfil Triglicéridos Tercer Ensayo Preliminar

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5	6	Fraccionamiento		
ANÁLISIS	Resultados							Sólido 1	Líquido	Sólido 2
TAG VOLATILES	6,37	5,75	6,74	5,14	4,05	5,43	4,43	3,61	6,37	2,56
PPP	2,15	12,43	13,45	16,16	15,80	17,44	17,19	23,07	4,71	5,67
MOP	5,97	2,86	2,08	1,95	1,94	1,58	1,59	1,53	4,07	1,71
PPS + PSP	2,03	10,25	11,42	14,42	15,28	16,17	16,73	25,16	4,42	44,55
POP	31,52	24,13	22,22	20,38	19,42	18,14	16,86	12,62	23,05	2,24
PLP	8,50	5,43	5,41	3,78	4,82	4,87	5,73	3,75	15,30	0,32
TAG intermedio 1.	0,00	2,19	2,62	4,03	4,36	4,83	5,55	8,86	18,71	0,18
PSS	8,13	20,52	21,30	21,71	21,06	20,12	19,05	13,75	13,14	28,68
POS	25,05	7,70	5,58	3,92	4,08	3,26	3,74	2,69	1,02	2,22
POO	0,00	2,05	1,03	2,10	2,26	2,29	3,13	0,93	0,00	3,27
PLS	6,00	1,87	1,30	1,26	1,41	0,97	0,60	0,05	3,42	0,64
PLO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
Indefinido	0,00	0,00	0,67	0,59	0,33	0,00	0,44	1,30	2,50	0,00
SSS	0,00	2,50	2,97	3,00	3,54	3,15	3,62	1,76	3,30	5,70
SOS	1,98	2,32	2,50	1,57	1,65	1,77	1,34	0,91	0,00	1,43
SOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49
SLS+OOO	2,29	0,00	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21
SLO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

ANEXO E

Diseño de experimentos con ácido esteárico de “Pureza Media”

Perfil Triglicéridos Experimento 1

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	3,33	0,94	6,36	9,88	3,91	4,93
PPP	1,02	1,63	4,94	5,63	4,30	6,44
MOP	1,90	2,60	1,81	1,88	1,14	1,65
PPS + PSP	0,60	3,23	7,14	8,70	8,14	12,64
POP	26,86	16,20	11,94	9,62	9,01	10,34
PLP	4,60	1,48	5,12	5,50	3,17	5,17
TAG intermedio 1.	0,91	1,22	3,71	3,80	2,94	4,16
PSS	3,81	1,70	3,67	5,77	7,49	9,01
POS	7,68	26,37	22,27	20,40	24,23	23,14
POO	42,28	23,73	10,02	7,24	9,65	4,28
PLS	1,47	2,63	2,23	2,06	2,53	1,37
PLO	0,00	0,69	1,25	0,68	0,39	1,29
Indefinido	0,15	0,54	0,66	1,02	0,31	0,79
SSS	0,45	0,30	0,86	1,20	1,57	1,46
SOS	1,55	8,85	12,55	11,49	14,96	10,51
SOO	3,40	7,88	4,18	3,52	5,80	2,80
SLS+OOO	0,00	0,00	0,51	0,76	0,47	0,00
SLO	0,00	0,00	0,16	0,87	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Perfil Triglicéridos Experimento 2

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	2,77	2,16	2,91	0,64	2,71	3,47
PPP	0,59	3,14	2,11	4,05	4,44	6,18
MOP	1,88	1,66	5,78	1,6	1,54	1,91
PPS + PSP	0,84	5,8	6,31	5,57	6,7	9,26
POP	27,19	17,06	15,66	13,65	10,82	11,56
PLP	5,18	4,03	4,09	2,6	3,77	1,85
TAG intermedio 1.	1,23	1,38	2,91	0,16	2,7	1,8
PSS	0,23	1,92	2,91	3,09	5,08	5,94
POS	6,16	19,81	23,54	26,62	25,49	25,37
POO	46,52	24,83	14,21	13,99	12,38	10,92
PLS	1,44	1,7	1,12	1,64	2,23	1,71
PLO	0,33	1,17	1,36	0,53	0,91	0,64

Indefinido	0,16	0,34	0,62	0,76	0,7	0,71
SSS	0,24	0,09	0,51	0,67	0,99	0,77
SOS	2,12	7,39	10,23	14,7	13,09	12,58
SOO	2,54	6,83	5,73	9,5	6,11	4,89
SLS+OOO	0,1	0,36	0	0	0	0
SLO	0,27	0,14	0	0	0,33	0,44
Indefinido	0,19	0,22	0	0,25	0	0
Indefinido	0	0	0	0	0	0
SOA	0	0	0	0	0	0
AOO	0	0	0	0	0	0

Perfil Triglicéridos Experimento 3

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	2,91	5,37	5,28	4,81	4,76	8,22
PPP	1,28	2,77	2,89	2,91	3,02	6,09
MOP	1,67	2,50	2,09	2,06	2,03	1,99
PPS + PSP	1,25	1,54	2,18	1,95	1,97	3,69
POP	22,10	18,30	17,34	14,74	13,39	14,25
PLP	2,73	3,39	2,78	3,07	2,77	2,31
TAG intermedio 1.	1,33	1,70	1,33	0,46	1,83	2,47
PSS	0,47	1,05	1,15	0,92	0,83	1,73
POS	7,73	15,44	17,29	19,93	20,08	19,03
POO	47,53	25,09	24,49	18,73	18,54	18,90
PLS	1,21	4,21	3,40	4,08	3,82	2,53
PLO	0,59	0,53	1,63	0,73	0,91	0,24
Indefinido	0,06	0,93	0,20	0,81	0,94	0,81
SSS	0,51	2,47	0,29	0,31	0,04	0,54
SOS	4,52	8,09	9,17	9,17	11,01	4,85
SOO	4,10	6,64	8,28	13,41	9,97	7,93
SLS+OOO	0,00	0,00	0,22	1,61	3,66	3,08
SLO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00	0,30	0,45	1,33
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Perfil Triglicéridos Experimento 4

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	5,27	7,55	7,94	6,77	3,57	7,6
PPP	1,52	2,13	3,73	3,92	2,66	6,29
MOP	3,37	3,23	3,87	1,98	1,78	2,71
PPS + PSP	0,98	4,95	1,66	1,22	0,9	1,79

POP	23,4	17,83	19,61	17,94	18,2	17,54
PLP	4,37	3,39	4,76	2,87	0,88	3,44
TAG intermedio 1.	1,03	1,96	2,82	0,53	1,36	4,04
PSS	0,33	0,59	1,06	0,77	0,58	1,76
POS	4,07	7,03	9,58	11,46	15,15	16,81
POO	41,08	36,62	25,88	32,06	37,74	14,04
PLS	5,02	5,35	3,4	5,77	2,65	7,12
PLO	1,35	3,26	2,14	0,69	0	1,27
Indefinido	0,13	0,42	0,22	1,06	0,5	1,75
SSS	0,35	0,1	0,24	0,13	0,12	0,58
SOS	1,91	2,31	3,76	5,71	6,5	7,38
SOO	4,06	2,46	6,58	4,41	6,99	2,7
SLS+OOO	1,1	0,43	2,43	2,08	0,29	2,98
SLO	0	0	0	0	0	0
Indefinido	0,2	0	0	0	0	0
Indefinido	0,1	0	0	0	0	0
SOA	0,38	0,4	0,3	0,62	0,12	0,19
AOO	0	0	0	0	0	0

Perfil Triglicéridos Experimento 5

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	7,4	8,3	2,8	2,4	1,9	2,1
PPP	2,2	3,1	2,4	2,1	1,5	2,2
MOP	2,1	2,7	1,3	0,9	0,8	1,0
PPS + PSP	0,6	0,7	1,6	2,3	1,8	1,1
POP	24,1	22,8	21,4	19,6	18,6	20,3
PLP	3,6	3,9	3,7	2,4	1,6	2,0
TAG intermedio 1.	0,3	2,0	2,3	1,5	1,2	1,2
PSS	0,2	0,5	0,6	0,5	0,4	1,2
POS	2,9	5,8	11,3	11,5	8,7	11,6
POO	36,9	34,4	25,9	30,9	40,3	41,8
PLS	5,2	6,8	7,2	3,6	1,6	2,7
PLO	1,6	1,8	1,7	1,1	0,6	0,5
Indefinido	0,5	0,6	0,4	0,0	0,1	0,3
SSS	0,4	0,2	1,4	0,5	0,4	1,0
SOS	3,5	2,1	7,0	9,7	9,6	7,9
SOO	8,1	2,3	5,9	9,1	9,2	3,2
SLS+OOO	0,9	1,6	1,6	1,1	0,9	0,1
SLO	0,0	0,0	1,0	0,7	0,2	0,0
Indefinido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indefinido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SOA	0,3	0,4	0,6	0,3	0,5	0,0
AOO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Perfil Triglicéridos Experimento 6

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	2,17	3	4,66	3,12	4,51	2,84
PPP	0,54	2,74	3,25	4,69	5,17	4,07
MOP	5,16	3,25	2,27	2,88	2,53	2,3
PPS + PSP	0,87	2,36	3,56	5,06	5,56	5,17
POP	31,46	26,53	21,26	22,09	20,24	19,83
PLP	9,36	9,43	8,5	7,69	7,15	4,76
TAG intermedio 1.	0,96	1,16	1,25	1,31	1,02	1,87
PSS	0	0,8	1,36	1,74	1,66	1,79
POS	7,96	12,28	13,24	16,76	18,34	19,47
POO	25,87	24,47	19,85	19,16	13,99	12,36
PLS	0	0	0	0	1,48	4,65
PLO	3,64	4	3,27	2,85	2,5	2,8
Indefinido	0	0	0,46	0,26	1,33	1,75
SSS	1,9	2,48	2,92	3,69	4,79	5,7
SOS	4,6	3,68	5,86	4,54	5,36	6,53
SOO	1,87	2,49	1,48	0,67	2,91	2,19
SLS+OOO	0	0,3	0	1,75	0	0,28
SLO	0	0	0	0,28	0	0,18
Indefinido	3,07	0,68	5,54	0,67	0,41	0,95
Indefinido	0,57	0,35	0,86	0,61	0,65	0,5
SOA	0	0	0,42	0,17	0,4	0
AOO	0	0	0	0	0	0

Perfil Triglicéridos Experimento 7

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	5,56	3,78	4,99	11,15	6,91	4,31
PPP	1,36	2,22	2,43	3,23	4,91	4,89
MOP	4,26	3,35	3,26	3,11	2,48	2,17
PPS + PSP	1,25	1,92	3,41	4,15	5,72	6,36
POP	27,53	25,69	22,43	20,56	19,79	21,15
PLP	10,22	7,21	7,12	6,41	5,15	3,23
TAG intermedio 1.	4,22	2,24	3,75	1,90	1,64	2,10
PSS	0,64	1,68	2,14	2,86	3,99	3,80
POS	8,03	11,72	12,98	15,17	16,93	22,43
POO	21,67	21,65	18,60	13,32	13,88	12,61
PLS	0,00	0,00	0,00	4,07	2,21	2,39
PLO	4,42	2,59	2,61	2,41	2,08	2,75
Indefinido	0,00	1,61	2,25	1,80	0,98	0,92
SSS	3,87	3,06	3,66	3,83	4,18	5,97
SOS	1,97	3,80	3,46	3,32	3,82	2,98

SOO	2,51	3,34	0,81	1,53	1,74	1,94
SLS+OOO	2,49	3,00	3,45	0,42	0,51	0,00
SLO	0,00	0,00	0,00	0,12	2,30	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,64	0,77	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	1,15	2,65	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Perfil Triglicéridos Experimento 8

Tiempo de Reacción (Horas)	0	1	2	3	4	5
ANÁLISIS	Resultados					
TAG VOLATILES	0,95	2,09	4,61	3,62	4,56	4,34
PPP	0,9	1,87	2,82	3,6	3,93	4,44
MOP	4,04	3,18	3,41	3,13	2,87	2,81
PPS + PSP	0,38	1,14	2,38	2,58	2,8	3,41
POP	29,63	26,56	26,27	26,65	25,83	24,53
PLP	10,82	8,23	6,77	5,72	6,02	5,12
TAG intermedio 1.	1,05	1,45	2,42	0,52	0,74	0,62
PSS	0	0,66	0,97	1,62	1,57	2,16
POS	8,41	9,68	11,37	12,23	9,4	13,05
POO	29,38	26,46	18,12	17,83	19,07	14,4
PLS	4,73	3,85	6,52	7,4	9,85	11,2
PLO	1,67	2,13	2,9	3,91	4,42	2,76
Indefinido	0,56	1,17	0,91	1,13	0,21	0,62
SSS	2,39	1,91	2,19	1,71	1,41	1,32
SOS	2,41	3,77	3,18	3,95	3,87	4,39
SOO	2,27	4,07	2,04	4,09	3,05	3,08
SLS+OOO	0	0,26	0	0	0	0
SLO	0,41	0,13	0,37	0,32	0,41	0,55
Indefinido	0	0,58	2,17	0	0	0,43
Indefinido	0	0,71	0,59	0	0	0,48
SOA	0	0,11	0	0	0	0,28
AOO	0	0	0	0	0	0

Perfil triglicéridos experimentos 9, 10 y 11 para la cuarta hora de reacción



RESULTADOS PERFIL DE TRIGLICERIDOS (TAG)

FECHA DE REALIZACIÓN

6 DE DICIEMBRE DE 2017 - 15 DICIEMBRE 2017

TIPO DE MUESTRA	MEZCLAS OLEÍNA DE PALMA - AC. ESTEÁRICO PUREZA MEDIA (CUARTA HORA DE REACCIÓN)
NUMERO DE MUESTRAS	3 MUESTRAS
OBSERVACIONES	Resultados expresados como porcentaje del total de TAG. Resultados normalizados y llevados a un total de 100%.

ANÁLISIS	MUESTRAS		
	Experimento 9	Experimento 10	Experimento 11
TAG VOLATILES	1,04	2,40	6,82
PPP	1,33	3,59	1,95
MOP	1,79	5,28	2,25
PPS + PSP	7,71	0,43	14,27
POP	15,09	27,34	12,47
PLP	0,11	2,27	0,36
TAG intermedio 1.	0,00	0,00	0,00
PSS	0,00	0,00	0,00
POS	26,29	34,76	16,01
POO	20,36	18,75	23,84
PLS	0,00	0,00	0,00
PLO	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,11	0,44	0,35
SSS	4,02	3,87	7,91
SOS	21,85	0,46	13,23
SOO	0,00	0,00	0,13
SLS+OOO	0,16	0,42	0,19
SLO	0,14	0,00	0,22
Indefinido	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00
TOTAL	100,0	100,0	100,0

DISEÑO DE EXPERIMENTOS CON ÁCIDO ESTEÁRICO DE PUREZA ALTA
Perfil de Triglicéridos para los 11 experimentos en la cuarta hora de reacción




RESULTADOS PERFIL DE TRIGLICERIDOS (TAG)

FECHA DE REALIZACIÓN	6 DE DICIEMBRE DE 2017 - 15 DICIEMBRE 2017
TIPO DE MUESTRA	MEZCLAS OLEÍNA DE PALMA - AC. ESTEÁRICO PUREZA ALTA (CUARTA HORA DE REACCIÓN)
NUMERO DE MUESTRAS	11 MUESTRAS
OBSERVACIONES	Resultados expresados como porcentaje del total de TAG. Resultados normalizados y llevados a un total de 100%.

ANÁLISIS	MUESTRAS										
	Experime nto 1	Experime nto 2	experime nto 3	Experime nto 4	Experime nto 5	Experime nto 6	Experime nto 7	Experime nto 8	Experime nto 9	Experimen to 10	Experimen to 11
TAG VOLATILES	0,71	1,09	0,85	0,04	0,22	0,22	0,19	1,01	0,57	1,02	0,61
PPP	0,71	0,84	1,20	0,14	0,81	0,63	0,23	1,47	1,91	0,42	1,96
MOP	1,24	1,28	1,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
PPS + PSP	7,82	2,70	7,07	0,14	2,86	0,59	0,01	3,74	0,13	0,52	3,16
POP	11,99	14,86	13,82	5,07	13,10	7,54	7,61	6,51	13,20	3,56	10,70
PLP	0,14	0,59	0,14	0,07	0,39	0,35	0,11	0,79	1,05	0,00	0,33
TAG intermedio 1.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00
PSS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
POS	38,02	26,76	19,64	25,96	33,50	32,38	15,98	30,27	27,99	31,29	39,73
POO	15,74	18,31	25,98	13,30	18,14	13,28	20,44	18,18	22,73	22,67	22,78
PLS	0,74	0,39	0,26	0,20	0,30	0,17	0,09	0,44	0,10	0,52	0,87
PLO	0,17	0,88	0,20	0,00	0,79	0,53	0,22	1,22	1,78	1,35	0,50
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,00
SSS	6,66	1,40	3,35	2,19	9,60	4,93	1,04	7,40	9,53	5,58	4,37
SOS	15,95	30,54	26,34	52,72	19,55	38,82	53,98	28,60	20,33	31,34	14,48
SOO	0,04	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,26	0,39
SLS+OOO	0,03	0,02	0,08	0,10	0,58	0,17	0,10	0,34	0,13	0,59	0,00
SLO	0,01	0,15	0,00	0,07	0,12	0,38	0,01	0,04	0,10	0,46	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Indefinido	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SOA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
AOO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

ANEXO F
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA MEZCLA GRASA DE REACCIÓN (VER CD)

Contenido de Grasa sólida
índice yodo
acidez

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016


AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES




Nosotros Yina Paola Díaz Corredor e Idania Lizeth Quintero Herreño en calidad de titulares de la obra Evaluación del proceso para la obtención de CBE, Mediante interesterificación enzimática de una mezcla grasa a nivel laboratorio en SIGRA S.A., elaborada en el año 2017, autorizamos al Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input checked="" type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:


AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, a los 21 días del mes de febrero del año 2018.

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Yina Paola	Díaz Corredor
Documento de identificación No	Firma
1052403206	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Idania Lizeth	Quintero Herreño
Documento de identificación No	Firma
1014256856	