

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ivana Vidalin

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2006.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Smjer: kemijsko inženjerstvo

Ivana Vidalin

Razdvajanje smjese organskih kiselina kristalizacijom

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Jasna Prlić-Kardum, viši asist.

Zagreb, lipanj 2006.

Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Bruni Zeliću, doc. koji mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima omogućio realizaciju ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. na stručnoj potpori i pomoći u izradi ovog rada.

Velika hvala mr. sc. Ani Vrsalović Presečki, mr. sc. Zvezdani Findrik i Ivani Roksa, dipl. inž. na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima i bratu Tomislavu za svu pomoć i podršku pruženu tijekom školovanja.

Hvala brojnim prijateljima koji su me podržavali kroz sve godine studiranja, a posebno se zahvaljujem kolegici Judith Siveri na nesebičnom prijateljstvu, potpori i pomoći tijekom studiranja i izrade ovog rada.

SAŽETAK

L-jabučna kiselina je komponenta staničnog metabolizma. Jedan je od ključnih spojeva u ciklusu proizvodnje energije u stanicama znanom kao ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus. Široko je rasprostranjena u prirodi gdje se pojavljuje u vrlo niskim koncentracijama. L-jabučna kiselina se dobiva ekstrakcijom iz jabučnog soka i biokonverzijom fumarne kiseline uz enzim fumarazu. Upotrebljava se u farmaceutskoj industriji, te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao konzervans (zamjena za limunsku kiselinu). Učinkovita je u liječenju bolesti jetre osobito hiperamonemije.

U ovom radu provedena je kristalizacija modelnih otopina fumarne i L-jabučne kiseline uz praćenje utjecaja promjene pH i temperature na učinkovitost procesa kristalizacije. Kinetika kristalizacije fumarne kiseline određena je u šaržnom sustavu. Na temelju rezultata ovih pokusa dizajniran je i proveden eksperiment kristalizacije modelnih otopina kiselina u kontinuiranim uvjetima provedbe procesa kristalizacije.

Ključne riječi: L-jabučna kiselina, fumarna kiselina, šaržna kristalizacija, kontinuirana kristalizacija, kinetika kristalizacije.

SUMMARY

L-malic acid is an intermediate of cell metabolism. It is one of the key compounds in a cell energy cycle process known as cycle of citric acid or Crebs cycle. L-malic acid is widely distributed in nature where it appears at low concentrations. It is used in pharmaceutical industry, as well as in food and cosmetic industries as an acidulent (a substitute for citric acid). Furthermore, it is very effective in treating liver diseases, especially hyperammonemia.

Crystallization of L-malic and fumaric acid solutions was studied in this project. Influence of the pH and temperature on the crystallization process efficiency was investigated in the batch crystallization process.

Kinetics of fumaric acid crystallization was determined in a batch system. Based on the results of these experiments continuous crystallization process was designed. Continuous crystallization of fumaric acid was performed at retention times determinate previously in measurement of fumaric acid crystallization kinetics.

Key words: L-malic acid, fumaric acid, batch crystallization, continuous crystallization, kinetic of crystallization

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. PROIZVODNJA I PRIMJENA L-JABUČNE KISELINE	3
2.1.1. Potpuno integrirana proizvodnja L-malata	5
2.2. BIOSEPARACIJSKI PROCESI	6
2.3. KRISTALIZACIJA	6
2.3.1. Mehanizam kristalizacije.....	9
2.3.2. Nukleacija.....	10
2.3.3. Rast kristala	12
2.3.4. Kinetika kristalizacije u šaržnim uvjetima	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. POPIS KEMIKALIJA.....	16
3.2. PRIPREMA OTOPINA	16
3.3. APARATURA	17
3.3.1. Aparatura za provedbu šaržne kristalizacije.....	17
3.3.2. Aparatura za provedbu kontinuirane kristalizacije.....	19
3.3.3. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	20
3.4. ANALITIČKE METODE	20
3.4.1. Određivanje koncentracije organskih kiselina UV/VIS spektrofotometrom.....	20
3.4.2. Određivanje koncentracije organskih kiselina kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC).....	21
3.5. PROVEDBA MJERENJA	21
3.5.1. Šaržna kristalizacija.....	21
3.5.2. Kontinuirana kristalizacija.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. ŠARŽNA KRISTALIZACIJA.....	23
4.1.1. Kontinuirano praćenje procesa šaržne kristalizacije	23
4.1.2. Diskontinuirano praćenje procesa šaržne kristalizacije.....	30

4.2. ODREĐIVANJE KINETIKE KRISTALIZACIJE U ŠARŽNOM KRISTALIZATORU	39
4.3. KONTINUIRANA KRISTALIZACIJA	41
5. ZAKLJUČAK.....	43
6. LITERATURA	44
7. POPIS SIMBOLA	45
8. PRILOG	46
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Racemična smjesa D,L-jabučne kiseline kemijski se proizvodi hidratacijom maleinske ili fumarne kiseline pri visokim temperaturama i tlakovima. Oko 85 % svjetske proizvodnje je kemijska sinteza racemata koji se ne može upotrijebiti u farmaceutskoj industriji, a u posljednje vrijeme se sve manje koristi i u prehrambenoj industriji (konzervans) jer ima lošija organoleptička svojstva od čistog prirodnog izomera L-jabučne kiseline. L-jabučna kiselina se dobiva ekstrakcijom iz jabučnog soka i biokonverzijom fumarne kiseline uz enzim fumarazu.

Biokemijsko inženjerstvo podijeljeno je na dvije discipline: biotransformacije (*upstream engineering*) i bioseparacije (*downstream engineering*). Pročišćavanje bioprodukata najčešće uključuje niz koraka, a svaki od njih zahtjeva upotrebu jedne ili više operacija, kao što su sedimentacija, adsorpcija i sušenje. Uklanjanje biomase, izolacija produkata, pročišćavanje i fino pročišćavanje tvore niz postupaka koji se primjenjuju na gotovo svakom produktu nakon što je dobiven biotransforacijom (Tablica 1.1.).

Tablica 1.1. Ciljevi i uobičajene jedinične operacije različitih stupnjeva izolacije bioprodukata¹

Stupanj	Svrha	Tipična jedinična operacija
Separacija netopljivih tvari	Uklanjanje ili sakupljanje stanica, staničnog debrisa ili drugih čestica. Smanjivanje volumena (ovisno o jediničnoj operaciji).	Filtracija, sedimentacija, ekstrakcija, adsorpcija.
Izolacija produkta	Uklanjanje tvari znatno različitih svojstava od svojstava željenog produkta. Smanjivanje volumena (ovisno o jediničnoj operaciji).	Ekstrakcija, adsorpcija, ultrafiltracija, precipitacija.
Pročišćavanje	Uklanjanje preostalih nečistoća koje su kemijskim i fizikalnim svojstvima slične željenom produktu.	Kromatografija, afinitetne metode, kristalizacija, frakcionalna precipitacija.
Fino pročišćavanje	Uklanjanje kapljevina. Pretvaranje produkta u kristaličan oblik.	Sušenje, kristalizacija.

Ova četiri stupnja koriste različite jedinične operacije, odnosno pojedinačne procese i opremu koja je potrebna za njihovo provođenje. Postoje različite kombinacije pojedinih jediničnih operacija za ova četiri stupnja ovisno o prirodi produkta dobivenog biotransformacijom¹.

Kristalizacija je toplinski separacijski proces nastajanja kristala iz homogene faze (otopine) koji rezultira nastajanjem nove faze, a njom se mogu dobiti bioproducti vrlo visoke čistoće (99,9 %). Općenito, procesi kod kojih dolazi do kristalizacije slični su i za molekule mikro dimenzija (soli i male organske molekule) i makro dimenzija (proteini, DNA, RNA). Proces kristalizacije jedna je od najčešće korištenih metoda izolacije i finog pročišćavanja bioproductata.

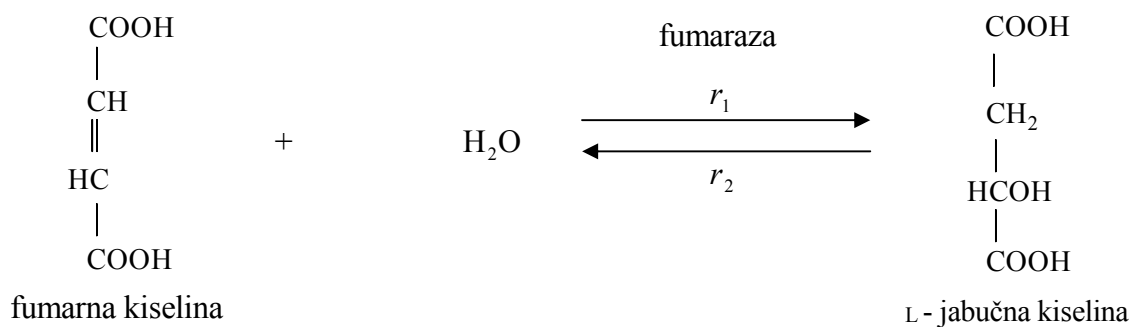
U ovom radu provedena je kristalizacija fumarne kiseline uz praćenje utjecaja promjene pH i temperature na učinkovitost procesa. Pokusi su provedeni u šaržnom i kontinuiranom kristalizadoru. Određena je kinetika kristalizacije fumarne kiseline u šaržnom kristalizadoru.

2. OPĆI DIO

2.1. PROIZVODNJA I PRIMJENA L-JABUČNE KISELINE

Jabučna kiselina spada u grupu visoko tonažnih kemikalija s potrošnjom od otprilike 40000 t godišnje. L-jabučna kiselina je komponenta staničnog metabolizma. Široko je rasprostranjena u prirodi gdje se pojavljuje u vrlo niskim koncentracijama. Ona je jedan od ključnih spojeva u ciklusu proizvodnje energije u stanicama znanom kao ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus².

Tradicionalno se dobiva ekstrakcijom iz jabučnog soka. Ovaj postupak je neekonomičan jer jabučni sok sadrži oko 0,4 – 0,7 % L-jabučne kiseline. Kemijskom hidratacijom fumarne kiseline dobiva se racematna smjesa D,L-jabučne kiseline koja nema jednaka svojstva kao optički čista L-jabučna kiselina³. Industrijski se L-jabučna kiselina proizvodi biokonverzijom fumarne kiseline uz prisustvo enzima fumaraze⁴ (Slika 2.1.) porijeklom iz a) suspenzije cijelih stanica *Corynebacterium glutamicum* i b) imobiliziranih cijelih stanica *Brevibacterium flavum*^{5,6}.

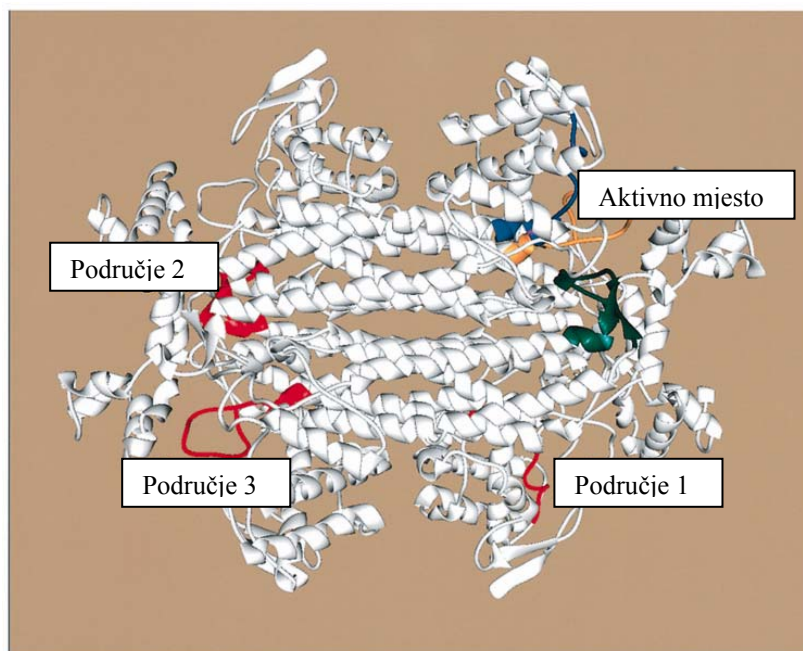


Slika 2.1. Biokonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu katalizirana enzimom fumarazom.

Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu s cijelim nerastućim stanicama pekarskog kvasca je ekonomičan, jer je enzim fumaraza sastavni dio staničnog metabolizma (prisutan u ciklusu limunske kiseline), a pekarski kvasac je dostupan i jeftin izvor tog enzima.

L-jabučna kiselina uglavnom se upotrebljava u farmaceutskoj industriji, te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao konzervans (zamjena za limunsku kiselinu). Učinkovita je u liječenju bolesti jetre osobito hiperamonemije, a upotrebljava se i kao jedna od komponenti u infuzijskim otopinama s aminokiselinama.

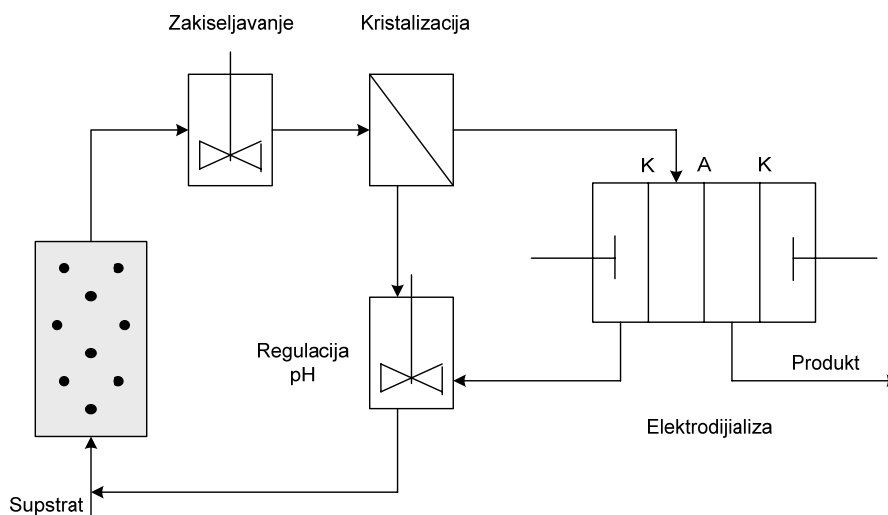
Fumaraza (Slika 2.2.) je stereospecifičan enzim, koji djeluje samo na trans izomer. Pripada porodici homolognih enzima i koristi fumarate kao uobičajeni supstrat/produkt u svom reakcijskom putu. Fumaraze su svrstane u dvije grupe; fumaraze prve grupe se nalaze u prokariotima, dimerni su enzimi, osjetljivi na temperaturu i ovisni o prisutnosti iona željeza, sa molekularnom masom od 120 kDa; fumaraze druge grupe su tetramerni enzimi, temperaturno stabilni i neovisni o prisutnosti željeza, s molekularnom masom od 200 kDa. Izvori fumaraza druge grupe su svinjsko srce, zečja jetra, kvasci i drugi mikroorganizmi⁷. Fumaraza sudjeluje u ciklusu limunske kiseline katalizirajući povratnu reakciju pretvorbe fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu (Slika 2.1.)^{4,8}. Ovaj enzim posjeduje apsolutnu specifičnost za supstrate fumaranu i L-jabučnu kiselinu. Na pH 7 brža je reakcija pretvorbe fumarne kiseline u L-jabučnu, koja je 100 %-tna na pH 9. Produkt ove reakcije, L-jabučna kiselina, se široko koristi u farmaceutskoj industriji i prehrambenoj industriji, što fumarazi daje veliku industrijsku važnost. Na aktivnost fumaraze izrazito utječu temperatura kao i vrsta i koncentracija aniona u ispitivanoj smjesi⁹.



Slika 2.2. Prostorni prikaz enzima fumaraze.

2.1.1. Potpuno integrirana proizvodnja L-malata

Enzimatska konverzija amonijevog fumarata u L-malat provodi se u reaktoru koji sadrži imobilizirani enzim fumarazu. Unatoč ograničenoj topljivosti supstrata u vodi, vodena otopina amonijeve soli fumarne kiseline se koristi kao supstrat koji protječe kroz kolonu. Nakon reakcije slijedi zakiseljavanje i kristalizacija u svrhu uklanjanja neizreagirano fumarata. Zatim slijedi elektrodijaliza kojom se regenerira L-jabučna kiselina iz kisele otopine amonijevog malata. Neizreagirana fumarina kiselina uklonjena kristalizacijom se neutralizira, te se zajedno sa razrijeđenom fumarinom kiselinom iz procesa elektrodijalize vraća u kolonu (Slika 2.3.)⁷.



Slika 2.3. Shema integriranog sustava proizvodnje L-malata.

2.2. BIOSEPARACIJSKI PROCESI

Bioseparacijski procesi čine posebnu disciplinu unutar kemijskog inženjerstva. Obuhvaćaju tehnike i metode koje se koriste pri izolaciji i pročišćavanju bioprodukata. Bioprodukti su kemijski spojevi ili grupe kemijskih spojeva dobiveni iz biološkog materijala i potrebno ih je izolirati i pročistiti do određene mjere prije distribucije na tržište. Dije se u tri grupe: male molekule (šećeri, organske i amino kiseline, alkoholi, ketoni, lipidi, vitamini), velike molekule (proteini, polisaharidi, nukleinske kiseline) i čestice (stanice, liposomi, substancične čestice). Bioprodukti su kemijski nestabilni pa tehnike potrebne za njihovu izolaciju i pročišćavanje ne zahtijevaju primjenu agresivnih kemikalija i ekstremnih procesnih uvjeta te su stoga prihvatljive za okoliš i spadaju u grupu održivih procesa. Bioprodukti su podložni gubitku aktivnosti pod djelovanjem atmosferilija pa ih je potrebno izolirati u čistom obliku. Zbog širokog spektra postojećih bioprodukata koriste se različite separacijske tehnike za njihovu izolaciju i pročišćavanje koje se odabiru ovisno o prirodi produkta. Najvažniji pokazatelji uspješnosti njihove izolacije su čistoća i aktivnost izoliranog produkta te iskorištenje procesa. Sve je veći interes za poboljšanje postojećih te razvoj novih bioseparacijskih procesa pošto oni čine između 50 i 90 % cijene koštanja gotovog proizvoda. Pri razvoju svakog bioseparacijskog procesa važne su analitičke metode i tehnike jer mala promjena sastava gotovog proizvoda tijekom uvećanja procesa ima za posljedicu znatne pozitivne ili negativne ekonomske učinke. Također je važna i stalna ekološko-ekonomska ocjena bioseparacijskog procesa.

2.3. KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je toplinski separacijski proces u kojem se čvrsta faza izdvaja iz kapljevite, plinovite ili druge čvrste faze. To je postupak proizvodnje kristala iz homogene faze¹⁰. Kod biokemikalija homogena faza iz koje se formiraju kristali uvijek je otopina. Pokretačka sila procesa je razlika koncentracija otopljene komponente u prezasićenoj otopini i upravo zasićenoj otopini, odnosno odstupanje od ravnoteže ili razlika temperatura kada se proces provodi hlađenjem. Kristalizacija je slična precipitaciji kod koje se čvrste čestice izoliraju iz otopine i imaju siromašnu morfologiju, za razliku od kristala kod kojih su sastavne molekule svrstane u trodimenzionalnom rasporedu i čine prostorne latice. Precipitacija se

odvija pri mnogo višim stupnjevima prezasićenja i stupnjevima nukleacije. Ostale razlike između kristalizacije i precipitacije navedene su u tablici 2.1¹.

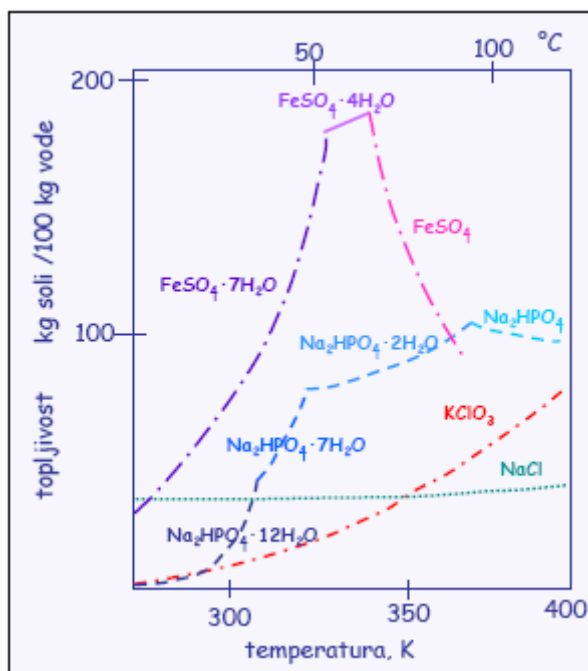
Tablica 2.1. Usporedba procesa kristalizacije i precipitacije.

	Kristalizacija	Precipitacija
Topljivost	Širokog raspona, obično srednje do visoko	Umjerena
Relativna prezasićenost	Niska	Visoka
Morfologija produkta	Dobro definirana	Loše definirana
Veličina kristala	Velika	Mala
Mehanizam nukleacije	Sekundarni	Primarni
Stupanj nukleacije	Nizak	Visok
Stupanj rasta	Širokog raspona	Nizak
Mogućnost kontrole	Kontrola je moguća	Teško za kontrolirati

Da bi došlo do kristalizacije potrebno je da kemijski potencijal čvrste faze bude manji od kemijskog potencijala te iste tvari u otopljenom stanju. Ako su potencijali jednaki sustav je u ravnoteži tj. otopina je zasićena. Da bi počela kristalizacija sustav mora doći u stanje prezasićenja što je moguće postići na nekoliko načina:

- hlađenjem otopine (smanjuje se topljivost),
- isparavanjem otapala (povećava se koncentracija otopine),
- vakuum kristalizacijom.

Porast temperature povećava topljivost pri čemu može doći do promjene stabilne kristalne forme (dolazi do hidratacije) što se očituje u diskontinuiranom obliku krivulje topljivosti (Slika 2.4.). Pažljivom regulacijom temperature tvar može kristalizirati u željenoj kristalnoj formi. Prisutnost nečistoća u otopini može utjecati na topljivost te usporiti brzinu nukleacije i rast kristala.

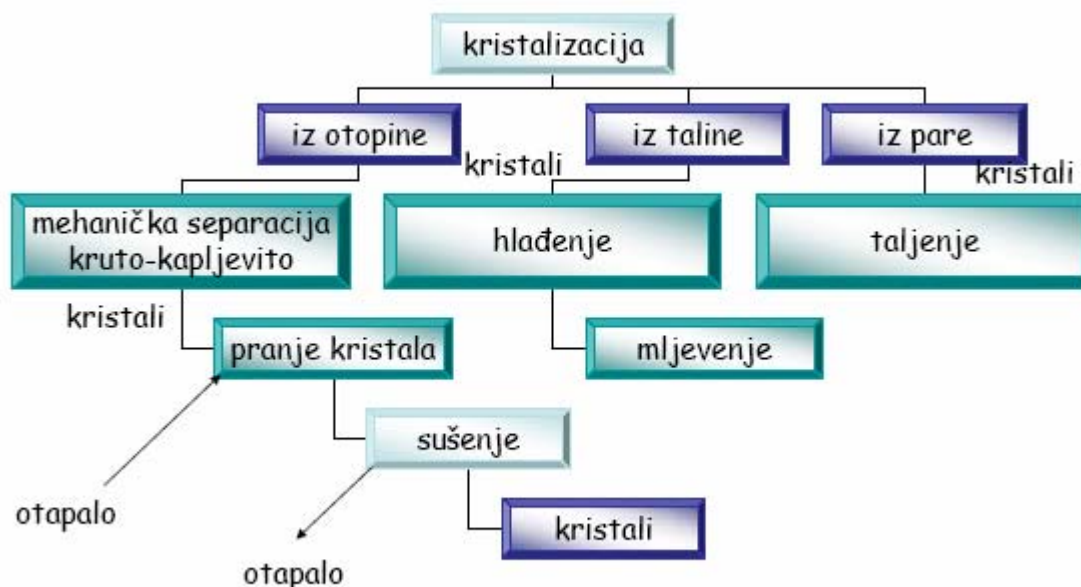


Slika 2.4. Dijagram topljivosti nekih anorganskih spojeva¹⁰.

Ovisno o ishodišnom sustavu kristalizacija može biti: iz otopine, iz taline ili iz pare (Slika 2.5.). Kristalizacija iz otopine može se provesti na dva načina:

- bez pomoćne komponente – isparavanjem otapala, hlađenjem ili zaleđivanjem,
- sa pomoćnom komponentom – izoliranjem, kemijskom reakcijom, adukcijskom kristalizacijom ili raspršivanjem.

Talina se sastoji od dvije ili više komponenti različitih temperatura tališta. Odvođenjem temperature u talini dolazi do parcijalnog nastajanja kristala drugačijeg sastava od početne taline. Komponenta s većom temperaturom tališta obogaćuje se kristalima, a separacija kristala i taline je djelomična. Potpuna separacija nastaje višestupnjevitom kristalizacijom u sustavima s potpunim miješanjem komponenti te sustavima u kojima nastaju miješani kristali. Kristalizacija iz plinske faze provodi se odvođenjem topline iz sustava pri čemu se komponenta koja desublimira direktno prevodi u kristale. Proces separacije je parcijalan jer preostala plinska smjesa sadrži određenu količinu desublimacijske tvari. Separacija smjese može se poboljšati višestupnjevitim protustrujnim procesom¹⁰.



Slika 2.5. Načini provedbe kristalizacije¹⁰.

Čistoća dobivenih bioprodukata je vrlo visoka (99,9 %) i kristalizacija se razmatra kao postupak izolacije i kao postupak pročišćavanja. Izolacija se odnosi na proces kojim se bioprodukt pretvara u konačan oblik za upotrebu. Za neke bioprodukte, kao što su antibiotici, konačan oblik mora biti kristaličan, a ponekad je čak potrebno da se postigne određena kristalna forma. U nekim slučajevima pročišćavanje koje se može postići kristalizacijom je toliko značajno da se mogu izbjeći drugi mnogo skuplji postupci kao što je primjerice kromatografija. Postoje dvije vrlo različite primjene kristalizacije u biotransformacijama i bioseparacijama: kristalizacija za izolaciju i pročišćavanje te kristalizacija za kristalografiju¹.

2.3.1. Mehanizam kristalizacije

Kada se kristali slobodno formiraju oni se pojavljuju u obliku poliedara ili krutina oblikovanih pomoću ravnih ploha. Iako relativne veličine ploha istog materijala mogu varirati kutovi između susjednih ploha istog materijala ne variraju i karakteristični su za tu tvar.

Kristalni oblici klasificirani su na temelju tipa kutova između susjednih ploha što je rezultiralo postojanjem sedam kristalnih sustava:

1. kubični ili teseralni: jedinična ćelija je kocka,
2. tetragonski: kocka je izdužena u jednom smjeru,
3. rompski ili ortorompski: bridovi jedinične ćelije također su međusobno okomiti, ali je duljina bridova u sva tri smjera različita,
4. trigonski ili romboedarski: jednaka je duljina bridova u sva tri smjera, ali bridovi međusobno nisu okomiti,
5. monoklinski: razlikuje se od ortorompskog time što bridovi uzduž jedne osi nisu okomiti s ravninom koju čine druge dvije osi,
6. triklinski: ni jedna od triju osi nije okomita na bilo koju drugu os,
7. heksagonski: strukturne jedinice čine šesterokute koji su naslagani jedan povrh drugoga¹¹.

Relativne veličine ploha kristala u određenom sustavu mogu jako varirati što rezultira nizom kristalnih oblika. Ova varijacija naziva se modifikacija oblika (građe). Primjerice, ako kristali rastu mnogo brže u jednom smjeru nastaju kristali u obliku igle. Na oblik kristala utječu uvjeti kristalizacije, osobito prisutnost nečistoća te korišteno otapalo ili otapala. Eventualno prisutne nečistoće mogu sprečavati rast kristala u određenim smjerovima.

2.3.2. Nukleacija

Primarna nukleacija javlja se u odsutnosti kristala dok se sekundarna nukleacija javlja u prisutnosti postojećih kristala. Primarna nukleacija može biti homogena ili heterogena. Kod homogene nukleacije nisu prisutne strane čestice dok kod heterogene nukleacije jesu. U praksi primarna nukleacija uglavnom je heterogena. Stupanj primarne nukleacije, bilo homogene ili heterogene, računa se pomoću sljedećeg izraza:

$$B = \frac{dN}{dt} = k_n (c - c^*)^n \quad (1)$$

B – broj nukleusa formiranih u jedinici volumena i jedinici vremena,

N – broj nukleusa u jedinici volumena,

k_n – konstanta nukleacije,

c – koncentracija otopine,
 c^* – koncentracija zasićenja,
 t – vrijeme,
 n – eksponent.

Razlika $(c-c^*)$ naziva se prezasićenje. Eksponent n može postići vrijednost 10 ali je uobičajeno između 3 i 4.

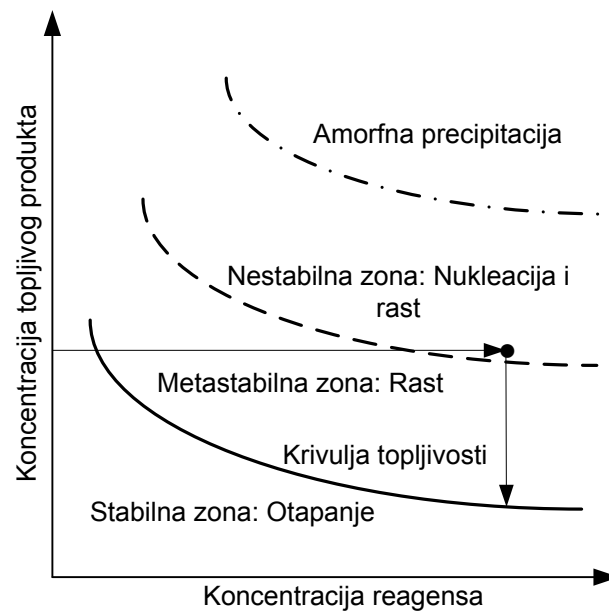
Eksperimentalni podaci iz industrijskih kristalizatora upućuju na to da sekundarna nukleacija uglavnom dominira. Dva su tipa sekundarne nukleacije: nukleacija smicanjem (eng. *shear*) i kontaktna nukleacija. Nukleacija smicanjem javlja se kao rezultat smicanja fluida na rastućim kristalnim ploham, a do kontaktne nukleacije dolazi zbog sudaranja kristala jednih sa drugima, sa mješalom, te sa drugim unutarnjim dijelovima posude kristalizatora. Najčešće korišten izraz za stupanj sekundarne nukleacije u kristalizaciji je:

$$B = \frac{dN}{dt} = k_l M_T^j (c - c^*)^b \quad (2)$$

k_l – konstanta,
 M_T – gustoća suspenzije.

Eksponent b može postići vrijednost 5, ali najčešće ima vrijednost 2. Eksponent j može postići vrijednost 1,2, ali mu je uobičajena vrijednost 1.

U kristalizaciji kao i u precipitaciji otopina mora biti prezasićena da bi došlo do formiranja kristala što se vidi i u jednadžbama (1) i (2). Ipak, kao što je naznačeno u faznom dijagramu (Slika 2.6.), prezasićenje mora biti iznad određene vrijednosti prije nego što će započeti nukleacija. U dijelu faznog dijagrama nazvanog metastabilna zona prezasićenje je tako nisko da nukleacija neće započeti. Kada je prezasićenje postiglo dovoljno veliku vrijednost da bude u nestabilnoj zoni faznog dijagrama započeti će nukleacija. U tom trenutku kristali počinju rasti, a prezasićenje se smanjuje. Jedna od mogućih provedbi kristalizacije naznačena je na faznom dijagramu. Ako je prezasićenje previsoko stupanj nukleacije je prevelik što rezultira stvaranjem amorfnih precipitata¹.



Slika 2.6. Fazni dijagram.

Brzina nukleacije uglavnom ovisi o stupnju prezasićenja otapala. Na brzinu nukleacije i širinu metastabilne zone utječu: nečistoće, pH, viskoznost, stanje tečljivosti, temperatura otopine¹⁰.

2.3.3. Rast kristala

Rast kristala je postnukleacijski proces u kojem se molekule u otopini vežu na površinu postojećih kristala. U inženjerske svrhe za dizajn kristalizatora najkorisniji izraz koji opisuje stupanj depozicije mase R tijekom rasta kristala je:

$$R = \frac{1}{A} \frac{dW}{dt} = k_G (c - c^*)^g \quad (3)$$

W – masa kristala po volumenu otapala,

A – omjer površine kristala i volumena otapala,

k_G – ukupni koeficijent prijenosa tvari.

EkspONENT g najčešće ima vrijednost između 0 i 2,5. Ukupni koeficijent prijenosa tvari, k_G ovisi o temperaturi, veličini kristala, hidrodinamičkim uvjetima, i prisutnosti nečistoća. Ponekad se koristi izraz za ukupni stupanj linearnog rasta, G :

$$G \equiv \frac{dL}{dt} = k_g (c - c^*)^g \quad (4)$$

L – jedna od karakterističnih dimenzija kristala, npr. duljina.

Dokazano je da geometrijski slični kristali od istog materijala rastu prema stupnju prikazanom jednadžbom 4, neovisno o veličini kristala. To je poznato kao delta L zakon. Iako je pronađeno nekoliko iznimaka od ovog zakona (npr. kada su kristali jako veliki) on je primjenjiv za veliki broj kristalizacija od industrijske važnosti.

Rast kristala je zapravo proces koji se sastoji od dva stupnja u seriji. Otopljene molekule dolaze do površine kristala difuzijom gdje moraju biti integrirane u latice. Ova dva procesa opisuju se kao:

Difuzija: $R = k_d (c - c_i)^d \quad (5)$

Površinska integracija: $R = k_r (c_i - c^*)^r \quad (6)$

c_i – koncentracija na granici faza između kapljevite i čvrste faze,
 k_d, k_r – koeficijenti prijenosa tvari.

Kada su eksponenti jednaki kombinacijom jednadžbi (3), (5) i (6) dobiva se izraz:

$$\frac{1}{k_G} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{k_r} \quad (7)$$

U slučaju kada je površinska integracija brža u usporedbi sa difuzijom tada je $k_r \gg k_d$ i
 $k_G \cong k_d$.

2.3.4. Kinetika kristalizacije u šaržnim uvjetima

Procjena vrijednosti nukleacije i stupnja rasta za vrijeme kristalizacije može se dobiti iz šaržnih eksperimenata metodom analize momenata. Uravnoteženjem masa po broju kristalnih čestica sa zadanim rangom veličina između L i $L + \Delta L$ jednačba populacijske bilance za veličinski nezavisan rast u šaržnom kristalizadoru sa miješanim konstantnim volumenom i zanemarivim trenjem i aglomeracijom postaje:

$$\frac{\partial n(L)}{\partial t} + G \frac{\partial n(L)}{\partial L} = 0 \quad (8)$$

K -ti moment raspodjele populacijske gustoće koji je funkcija duljine kristala L je definiran kao:

$$\mu_k \equiv \int_0^{\infty} n(L) L^k dL \quad (9)$$

Ako se momenti eksperimentalne funkcije populacijske gustoće mogu odrediti u dva trenutka koji se razlikuju za mali vremenski interval Δt u kojem se može postići linearnost modela, tada se prosječne vrijednosti nukleacije (\bar{B}) i stupnja rasta (\bar{G}) mogu izraziti kao:

$$\bar{B} = \frac{\Delta \mu_0}{\Delta t} \quad (10)$$

$$\bar{G} = \frac{\Delta \mu_0}{\mu_0 \Delta t} \quad (11)$$

Ovdje Δ predstavlja razliku količinskih vrijednosti u dva različita vremena i prikazan je kao aritmetički prosjek količina. Ove su jednačbe derivirane po momentu transformacije jednačbe populacijske bilance s obzirom na veličinu (jednačba 8). Prosječni stupanj nukleacije \bar{B} i prosječni ukupni linearni stupanj rasta \bar{G} mogu se izračunati pomoću dva grafa (dijagrama) eksperimentalne populacijske gustoće iz eksperimenta šaržne kristalizacije u vremenu t i $t + \Delta t$. Prosječna veličina \bar{L} u svakom vremenu može se dobiti iz momenata:

$$\bar{L} = \frac{\int_0^{\infty} n(L)LdL}{\int_0^{\infty} n(L)dL} = \frac{\mu_1}{\mu_0} \quad (12)$$

Značenje svakog k -tog momenta u populaciji kristalizacije dano je u tablici 2.2¹.

Tablica 2.2. Analiza momenata za distribuciju veličina kristala.

Moment	k momenta	Značenje momenta	Matematička definicija	Prosječna vrijednost za sferične kristale
μ_0	0	Broj kristala	$\int_0^{\infty} n(L)dL$	
μ_1	1	Veličina kristala	$\int_0^{\infty} n(L)LdL$	$\frac{\mu_1}{\mu_0}$
μ_2	2	Područje kristala ^a	$\int_0^{\infty} n(L)L^2dL$	$\pi \left(\frac{\mu_2}{\mu_0} \right)$
μ_3	3	Masa kristala ^b	$\int_0^{\infty} n(L)L^3dL$	$\frac{\pi\rho}{6} \left(\frac{\mu_3}{\mu_0} \right)$

a) za sfere faktor oblika područja = π

b) za sfere faktor oblika volumena = $\pi/6$

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu proučavan je proces kristalizacije modelnih otopina L-jabučne i fumarne kiseline. Praćen je utjecaj promjene pH i temperature na učinkovitost procesa kristalizacije čistih kiselina i smjese kiselina. Kinetika kristalizacije fumarne kiseline određena je u šaržnom sustavu. Na temelju rezultata ovih pokusa dizajniran je i proveden eksperiment kristalizacije modelnih otopina kiselina u kontinuiranim uvjetima provedbe procesa kristalizacije.

3.1. POPIS KEMIKALIJA

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 , (*Kemika*)
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , (*Kemika*)
- kalijev hidroksid, KOH, (*Kemika*)
- sulfatna kiselina, 96%-tna, (*Kemika*)
- fumarna kiselina, $C_4H_4O_4$, (*Fluka*)
- L-jabučna kiselina, $C_4H_6O_5$, (*Fluka*)
- perklorna kiselina, $HClO_4$, (*Merck*).

3.2. PRIPREMA OTOPINA

U ovom radu korištene su sljedeće otopine:

1. fosfatni pufer, pH = 7
 - 22,68 g K_2HPO_4 i 9,50 g KH_2PO_4 otopljeno je u 1000 ml destilirane vode
2. otopine fumarne kiseline
 - kristali fumarne kiseline otopljeni su u destiliranoj vodi i pripremljene su otopine koncentracija 50, 100, 150 i 200 mmol dm⁻³

3. otopina L-jabučne kiseline
 - kristali L-jabučne kiseline otopljeni su u destiliranoj vodi i pripremljena je otopina koncentracije 100 mmol dm^{-3}

4. smjesa L-jabučne i fumarne kiseline
 - u smjesi volumena 500 mL koncentracija L-jabučne kiseline je 100 mmol dm^{-3} kao i koncentracija fumarne kiseline

5. eluent za HPLC
 - redestilirana voda kojoj je pH podešen na 2,10 - 2,15 dodatkom perklorne kiseline

6. otopina sulfatne kiseline, $c = 2 \text{ mol dm}^{-3}$

3.3. APARATURA

3.3.1. Aparatura za provedbu šaržne kristalizacije

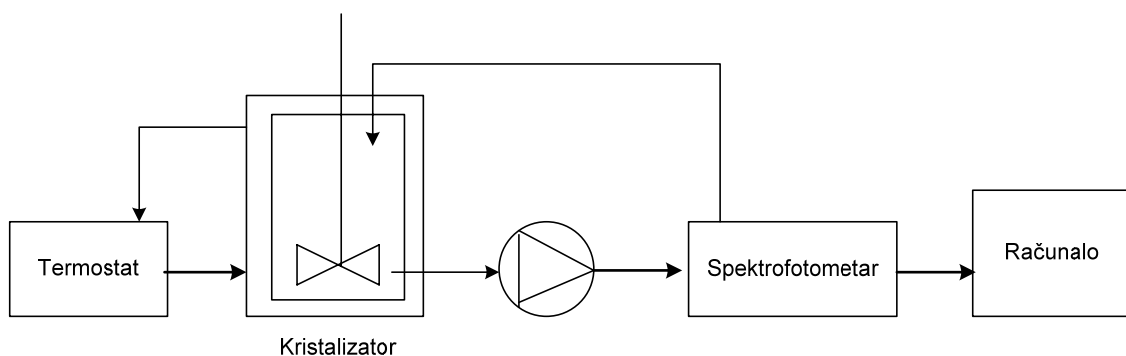
Aparaturu za provedbu šaržne kristalizacije čine:

- termostat (THERMOMIX 1420, B.BRAUN)
- magnetska miješalica (TEHTNICA ŽELEZNIKI MM-540)
- kristalizator sa dvostrukim stjenkama
- peristaltička pumpa (ALITEA XV)
- dvozračni spektrofotometar (SHIMADZU UV-1601)



Slika 3.1. Aparatura za provedbu šaržne kristalizacije.

Modelne otopine čistih kiselina termostatirane su na temperaturama 17,5, 20, 25 i 30 °C u kristalizatoru sa dvostrukim stjenkama pomoću termostata. Postepenim dodavanjem 2 mol dm^{-3} sulfatne kiseline smanjivan je pH što je praćeno pomoću pH-metra. Otopina se pomoću peristaltičke pumpe pumpa kroz protočnu kivetu spektrofotometra, a zatim se vraća nazad u kristalizator (Slike 3.1. i 3.2.).



Slika 3.2. Shematski prikaz šaržne kristalizacije.

3.3.2. Aparatura za provedbu kontinuirane kristalizacije

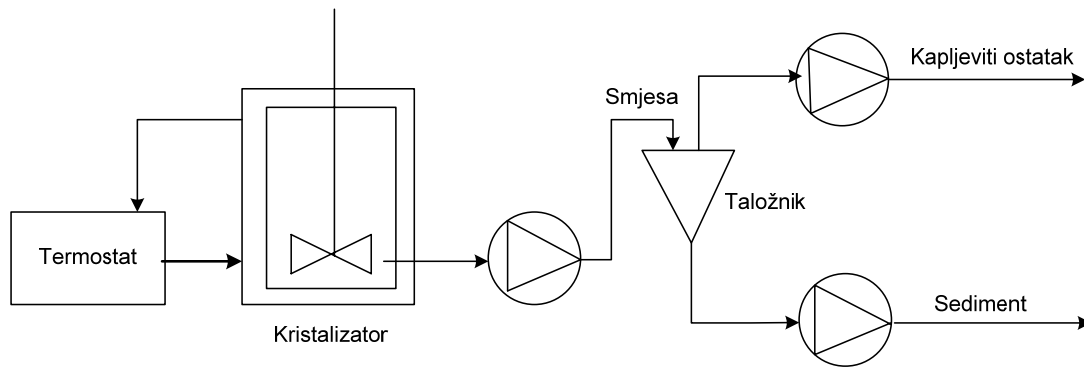
Aparaturu za provedbu kontinuirane kristalizacije čine:

- termostat (THERMOMIX 1420, B.BRAUN)
- magnetska miješalica (IKA COMBIMAG REF)
- kristalizator sa dvostrukim stjenkama
- peristaltička pumpa (ALITEA XV; FE 411, B.BRAUN)
- taložnik



Slika 3.3. Aparatura za provedbu kontinuirane kristalizacije.

Pomoću 2 mol dm^{-3} sulfatne kiseline podešen je pH modelnih otopina čistih kiselina na vrijednost $\text{pH} = 2$. Otopine su zatim termostatirane u posudi sa dvostrukim stjenkama pomoću termostata. Smjesa se pomoću peristaltičke pumpe (FE 411, B.BRAUN) pumpa na vrh termostatiranog taložnika. Sa dna taložnika odvode se kristali (sediment), pomoću jedne peristaltičke pumpe, a sa vrha bistra otopina (kapljeviti ostatak), pomoću druge peristaltičke pumpe (Slike 3.3. i 3.4.).



Slika 3.4. Shematski prikaz kontinuirane kristalizacije.

3.3.3. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline su određene HPLC-om (Sykam, SHIMADZU) opremljenim sa UV-VIS detektorom (SPD-10A, SHIMADZU) na 210 nm, pri temperaturi od 30 °C. Uređaj je bio opremljen integratorom (C-R6A, Sykam) i termostatom (4110, Sykam).

3.4. ANALITIČKE METODE

3.4.1. Određivanje koncentracije organskih kiselina UV/VIS spektrofotometrom

UV/VIS spektrofotometrom (SHIMADZU UV-1601) u protočnoj i neprotočnoj kivetu određene su koncentracije fumarne kiseline pri valnoj duljini $\lambda = 290$ nm i L-jabučne kiseline pri $\lambda = 225$ nm.

3.4.2. Određivanje koncentracije organskih kiselina kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)

Koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline su određene kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC) sa UV detektorom pri valnoj duljini od 210 nm na Hibar RT Pre-packed koloni s punilom LiChrosorb, RP-18 (5 μm). Kao mobilna faza je korištena redestilirana voda (pH = 2,10 - 2,15 podešen dodatkom perklorne kiseline) pri protoku eluenta od 0,7 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ i temperaturi od 30 $^\circ\text{C}$. Standardne otopine fumarne i L-jabučne kiseline su pripravljene otapanjem poznatih masa standarda u redestiliranoj vodi. Na taj način su dobiveni baždarni pravci (Prilog 1. i 2.). Za te uvjete vrijeme zadržavanja fumarne kiseline je iznosilo 5,3 min, a L-jabučne kiseline 2,6 min.

3.5. PROVEDBA MJERENJA

3.5.1. Šaržna kristalizacija

Šaržna kristalizacija proučavana je u šaržnom kristalizatoru kontinuiranim i diskontinuiranim mjerenjem promjene koncentracije u spektrofotometru.

Otopina fumarne kiseline početnog pH = 7 te $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ termostatorana je u reaktoru tijekom 5 minuta na temperaturi od 25 $^\circ\text{C}$. Nakon svakih 5 minuta pH vrijednost otopine smanjivana je za 0,25 jedinica dodavanjem 2 mol dm^{-3} sulfatne kiseline pri čemu je kontinuirano praćena promjena apsorbancije na spektrofotometru. Napravljena je serija eksperimenata za različite temperature otopine (17,5 $^\circ\text{C}$, 20 $^\circ\text{C}$, 25 $^\circ\text{C}$, 30 $^\circ\text{C}$) te za različite početne koncentracije fumarne kiseline (50, 100, 150, 200 mmol dm^{-3}) sa svrhom pronalaženja optimalnih uvjeta provedbe procesa kristalizacije. Proveden je i šaržni pokus uz kontinuirano praćenje procesa kristalizacije za otopinu L-jabučne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Određena je kinetika kristalizacije otopine fumarne kiseline pri prethodno određenim optimalnim uvjetima provedbe procesa praćenjem promjene vrijednosti apsorbancije u vremenu za tri različite pH vrijednosti otopine: pH = 2, pH = 2.5, pH = 3.

Proces kristalizacije diskontinuirano je praćen u šaržnom kristalizatoru tako da su otopine fumarne kiseline različitih koncentracija (50, 150, 200 mmol dm^{-3}) termostatorane

preko noći na $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isto tako otopina fumarne kiseline $c = 100\text{ mmol dm}^{-3}$ termostatorana je preko noći na različitim temperaturama ($17,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.5.2. Kontinuirana kristalizacija

Otopina fumarne kiseline $c = 100\text{ mmol dm}^{-3}$, $V = 500\text{ mL}$ i $\text{pH} = 2$ podešene dodatkom $2\text{ mol dm}^{-3}\text{ H}_2\text{SO}_4$ termostatorana je u reaktoru na $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pomoću peristaltičke pumpe ($q = 20\text{ mL min}^{-1}$) otopina je pumpana na vrh termostatoranog taložnika u kojem je došlo do razdvajanja sedimenta i kapljevitoog ostatka. Pomoću druge dvije pumpe ($q = 10\text{ mL min}^{-1}$) kontinuirano su iz taložnika odvođeni sediment i kapljeviti ostatak te su uzimani uzorci svake 2,5 minute za određivanje koncentracije fumarne kiseline HPLC-om. Također je provedena i kontinuirana kristalizacija smjese L-jabučne kiseline ($c_J = 100\text{ mmol dm}^{-3}$) i fumarne kiseline ($c_F = 100\text{ mmol dm}^{-3}$) termostatorane pri $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V = 500\text{ mL}$, $\text{pH} = 2$. Sa vrha taložnika pumpom su uzimani uzorci kapljevitoog ostataka, a sa dna uzorci sedimenta. HPLC-om je u uzorcima određena koncentracija L-jabučne i fumarne kiseline.

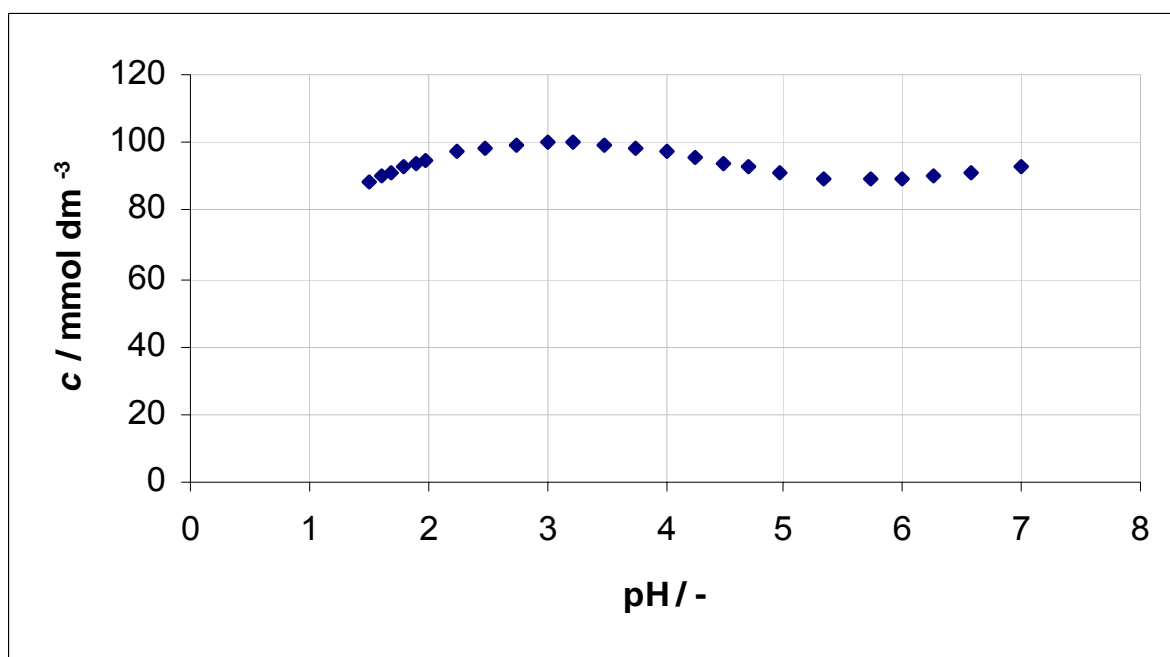
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu praćen je utjecaj temperature, koncentracije i pH modelnih otopina fumarne i jabučne kiseline na učinkovitost procesa kristalizacije. Proces kristalizacije proučavan je u šaržnom kristalizatoru, a promjena koncentracije modelnih otopina fumarne i L-jabučne kiseline praćena je kontinuirano (*on-line*) mjerenjem promjene apsorbancije ovih kiselina. Isto tako, proces kristalizacije modelnih otopina fumarne i L-jabučne kiseline praćen je diskontinuirano u šaržnom kristalizatoru. Kinetika procesa kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline pri različitim pH vrijednostima praćena je u šaržnom kristalizatoru. Na temelju procijenjene kinetike procesa šaržne kristalizacije proveden je proces kontinuirane kristalizacije fumarne kiseline, kao i smjese fumarne i L-jabučne kiseline.

4.1. ŠARŽNA KRISTALIZACIJA

4.1.1. Kontinuirano praćenje procesa šaržne kristalizacije

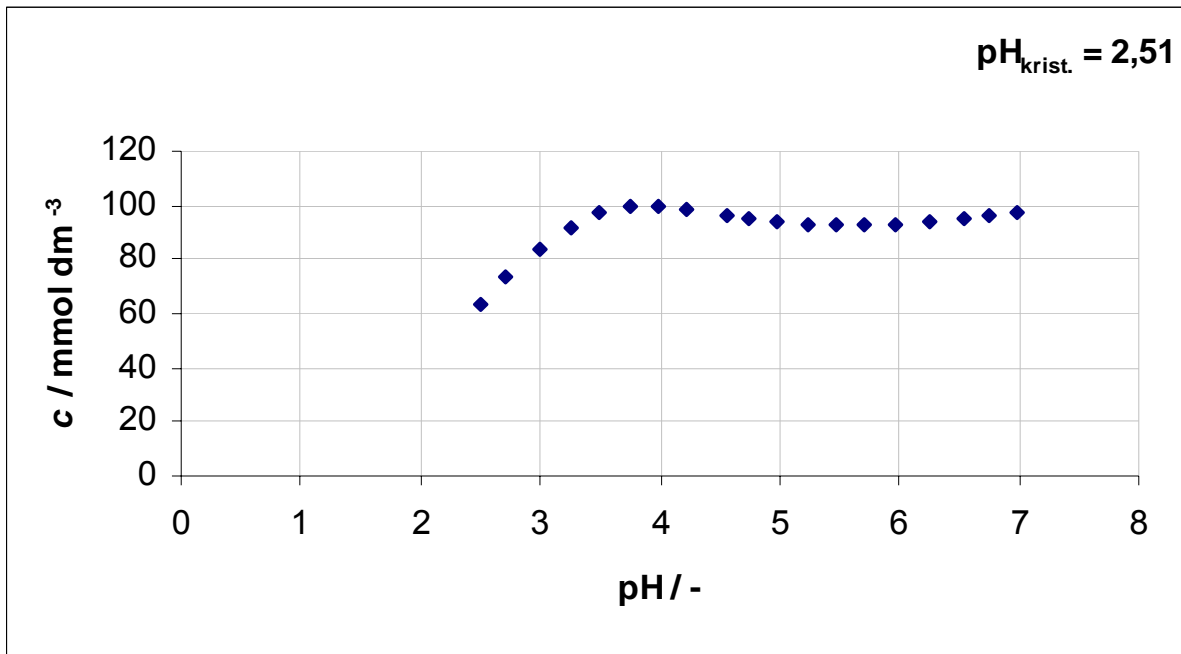
Na slici 4.1. prikazani su rezultati provedbe procesa šaržne kristalizacije modelne otopine L-jabučne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Promjena koncentracije praćena je kontinuiranim mjerenjem apsorbancije u protočnoj kiveti spektrofotometra pri valnoj duljini $\lambda = 225 \text{ nm}$ (Slike 3.1. i 3.2.).



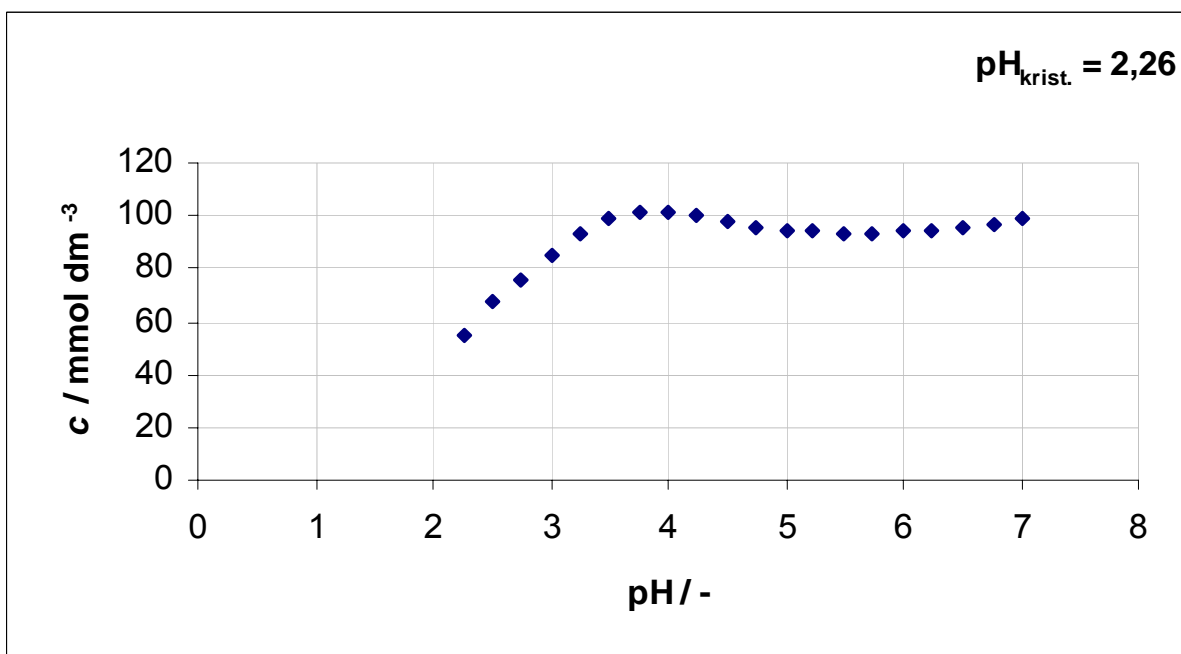
Slika 4.1. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine L-jabučne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Iz rezultata provedbe procesa zakiseljavanja modelne otopine L-jabučne kiseline vidljivo je da promjena pH ne uzrokuje kristalizaciju unutar analiziranog područja ($\text{pH} = 1,5 - 7$) (Slika 4.1.). Ovim je zadovoljena pretpostavka selektivne kristalizacije fumarne kiseline te je u idućim pokusima proučavan utjecaj pH, temperature i koncentracije na proces kristalizacije fumarne kiseline.

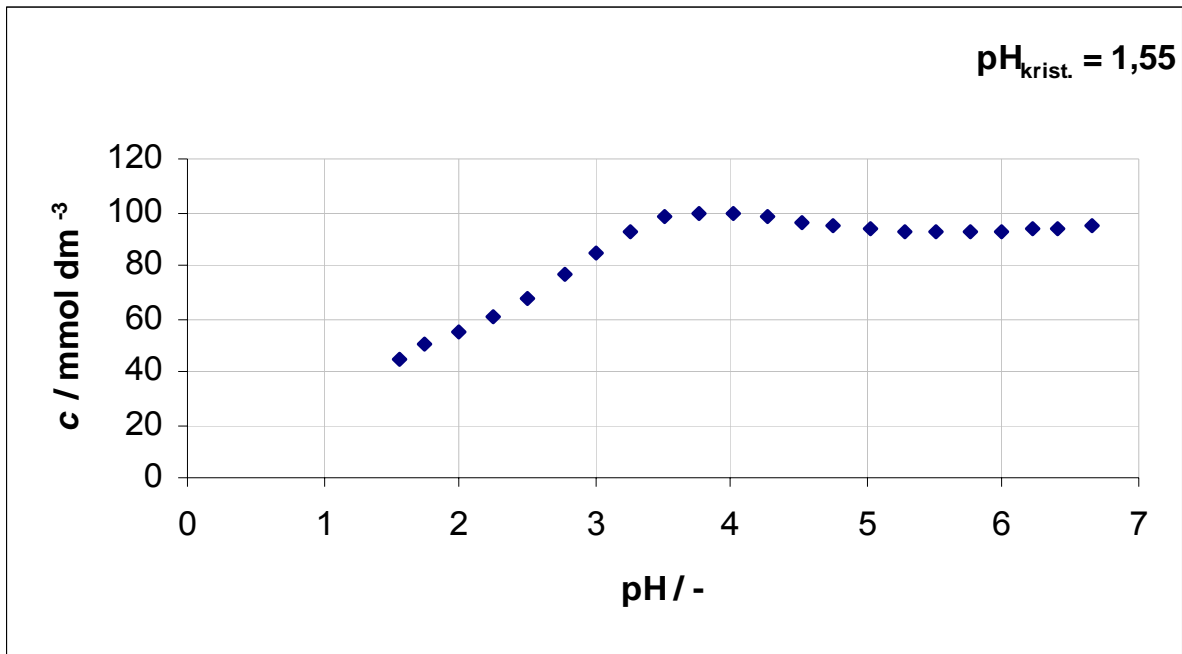
Prvo je proučavan utjecaj promjene temperature i pH na proces šaržne kristalizacije fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$. Na slikama 4.2., 4.3., 4.4. i 4.5. prikazana je promjena koncentracije fumarne kiseline u kapljevini za različite pH otopine pri temperaturama $17,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Promjena koncentracije praćena je kontinuiranim mjerenjem u protočnoj kiveti spektrofotometra pri valnoj duljini $\lambda = 290 \text{ nm}$.



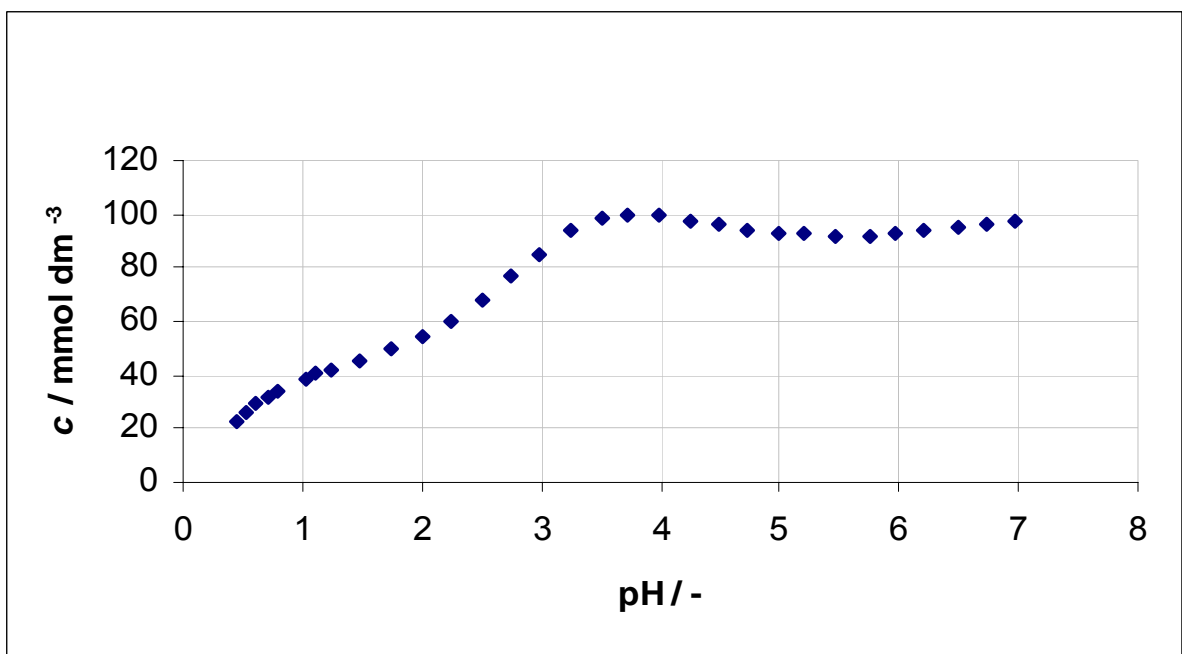
Slika 4.2. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 17,5 \text{ } ^\circ\text{C}$.



Slika 4.3. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 20 \text{ } ^\circ\text{C}$.



Slika 4.4. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 4.5. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

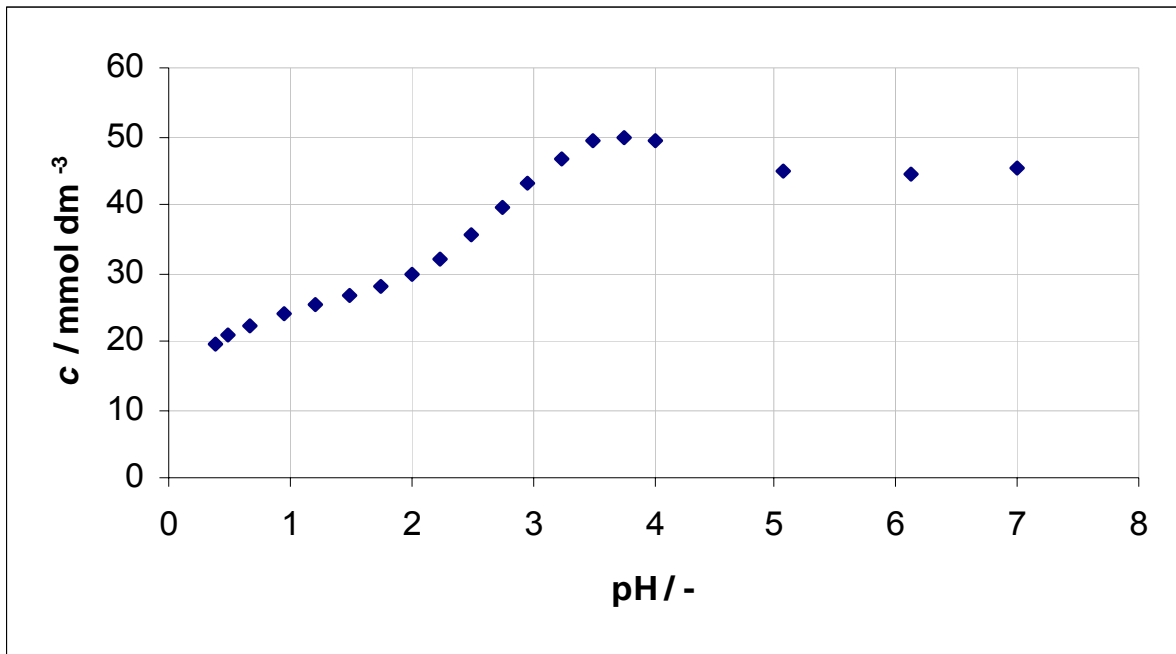
Za razliku od procesa kristalizacije L-jabučne kiseline, uočeno je povećanje koncentracije fumarne kiseline u pH području od 6,5 – 4 što je posljedica mjerne pogreške uzrokovane utjecajem kontinuiranog dodavanja H_2SO_4 korištenog za regulaciju pH vrijednosti otopine. Uočen je i vidljiv pad koncentracije fumarne kiseline pri nižim pH vrijednostima otopine. Osim toga pri temperaturama 17,5, 20 i 25 °C vizualno je detektirana pojava kristala fumarne kiseline (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Utjecaj temperature na pH vrijednost vizualne pojave kristala fumarne kiseline za koncentraciju otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$.

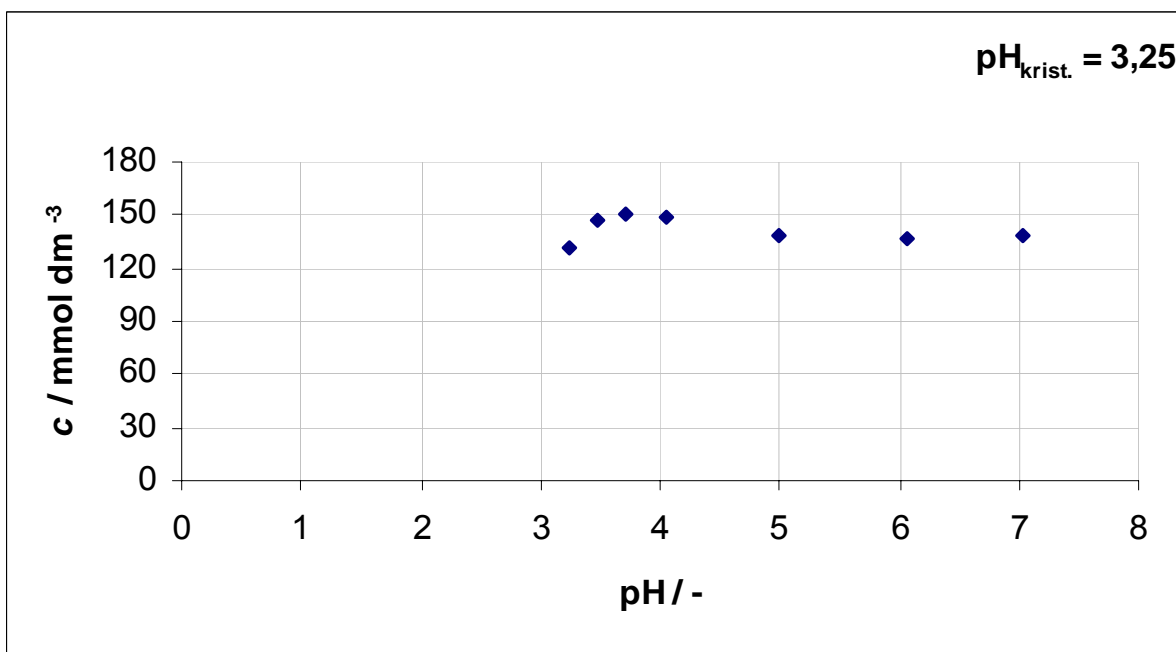
T / °C	30	25	20	17,5
pH / -	-	1,55	2,26	2,51

Na temperaturi 30 °C nije opaženo nastajanje kristala unutar proučavanog pH područja. Vidljivo je da smanjenjem temperature dolazi do povećanja pH vrijednosti pri kojoj dolazi do vidljive pojave kristala.

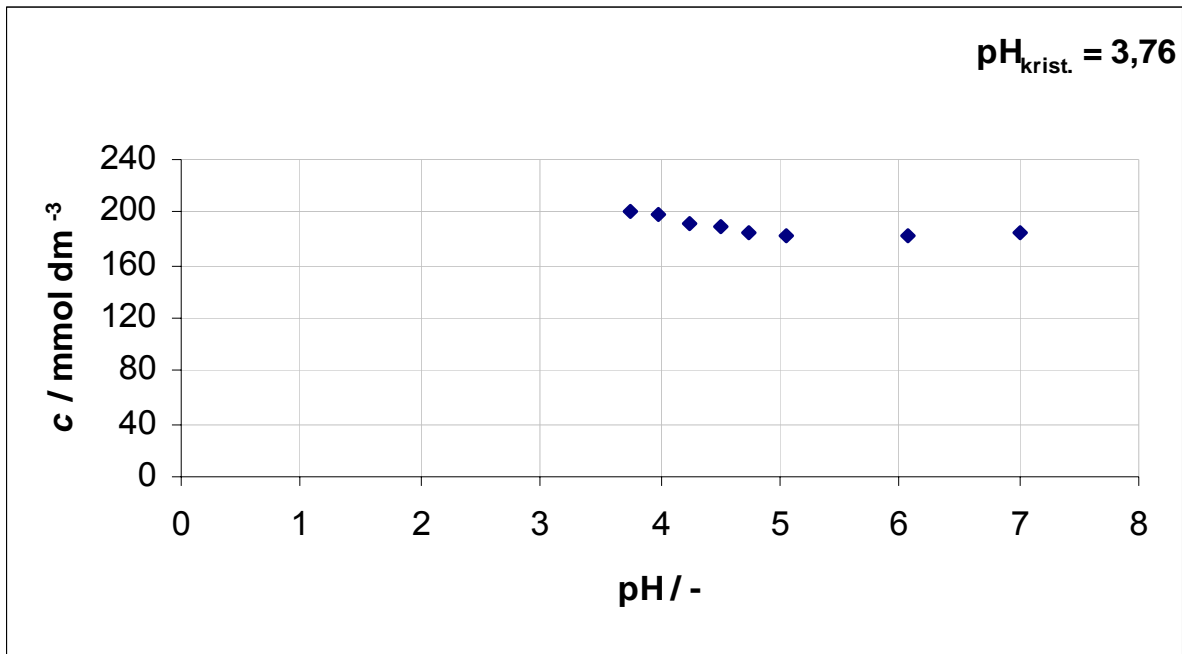
Osim utjecaja promjene temperature proučavan je i utjecaj različitih koncentracija modelne otopine fumarne kiseline (Slike 4.4., 4.6., 4.7. i 4.8.). U pH području od 7 – 0,40 analizirane su slijedeće koncentracije fumarne kiseline: $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri konstantnoj temperaturi $T = 25 \text{ °C}$.



Slika 4.6. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 4.7. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 4.8. Utjecaj pH na proces kristalizacije modelne otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 4.2. Utjecaj koncentracije na pH vrijednost vizualne pojave kristala fumarne kiseline za temperaturu otopine fumarne kiseline $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

$c / \text{mmol dm}^{-3}$	50	100	150	200
pH / -	-	1,55	3,25	3,76

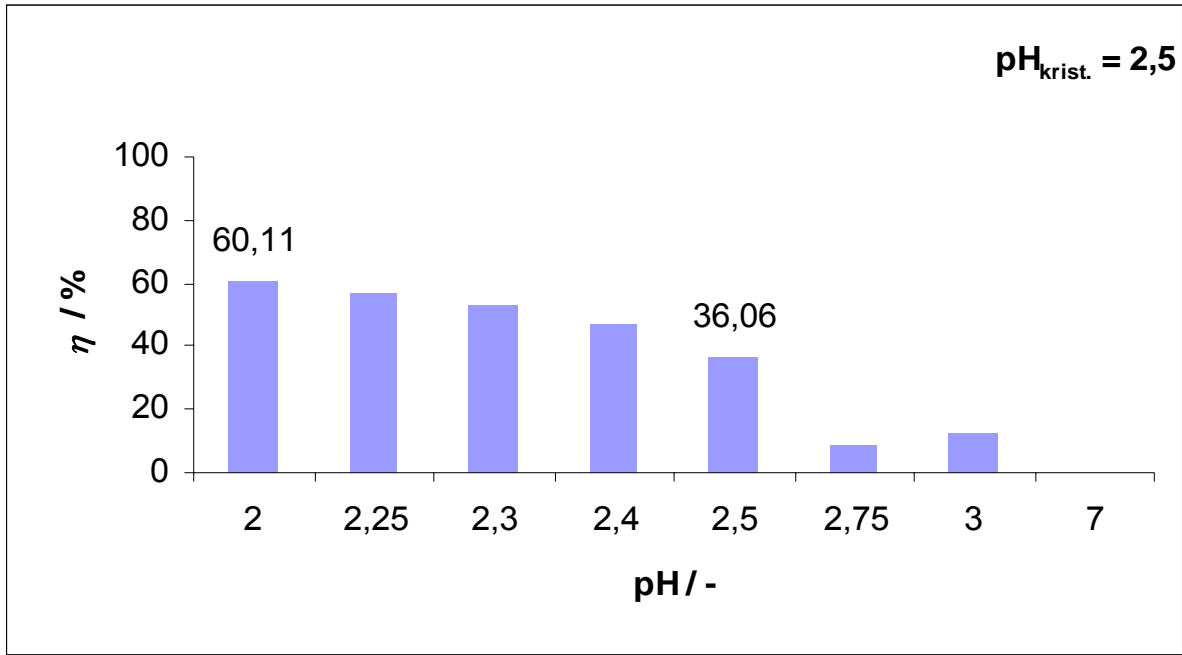
Utjecaj koncentracije na pH vrijednost vizualne pojave kristala fumarne kiseline prikazan je u Tablici 4.2. Opaženo je da se pojava kristala pomiče prema većim pH vrijednostima povećanjem koncentracije otopine fumarne kiseline. Ova pojava nije opažena za najmanju analiziranu koncentraciju fumarne kiseline. Treba napomenuti da je smanjenje koncentracije fumarne kiseline u području pH vrijednosti pri kojima ne dolazi do vidljivog nastajanja kristala uzrokovano procesom nukleacije (Slike 4.2. – 4.8.).

4.1.2. Diskontinuirano praćenje procesa šaržne kristalizacije

Diskontinuiranim mjerenjem u termostatu šaržnog kristalizatora proučavan je utjecaj promjene temperature i pH otopine fumarne kiseline koncentracije $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ na učinkovitost procesa kristalizacije. Rezultati provedbe procesa pri različitim temperaturama (20, 25, 30 °C) prikazani su u tablicama 4.3, 4.4. i 4.5. i na slikama 4.9., 4.10. i 4.11. Promjena koncentracije određena je mjerenjem apsorbancije u kiveti spektrofotometra pri valnoj duljini $\lambda = 290 \text{ nm}$.

Tablica 4.3. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 20 \text{ °C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

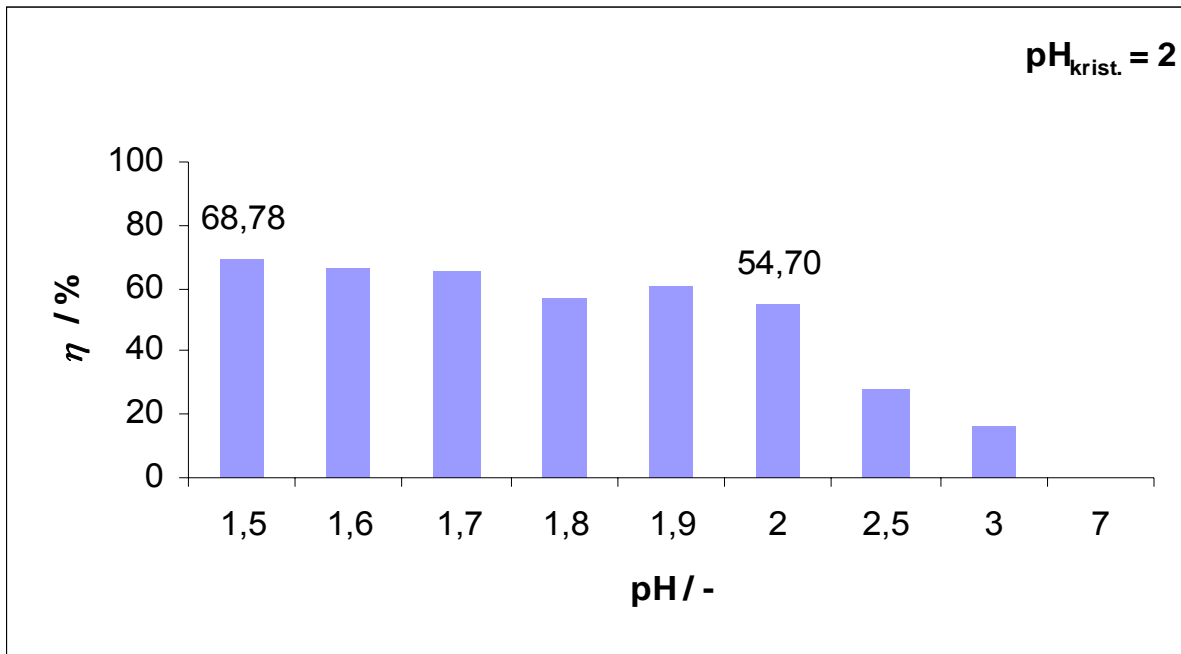
pH	$\eta / \%$
7	0
3	12,34
2,75	8,19
2,5	36,06
2,4	47,13
2,3	53,08
2,25	56,38
2	60,11



Slika 4.9. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

Tablica 4.4. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

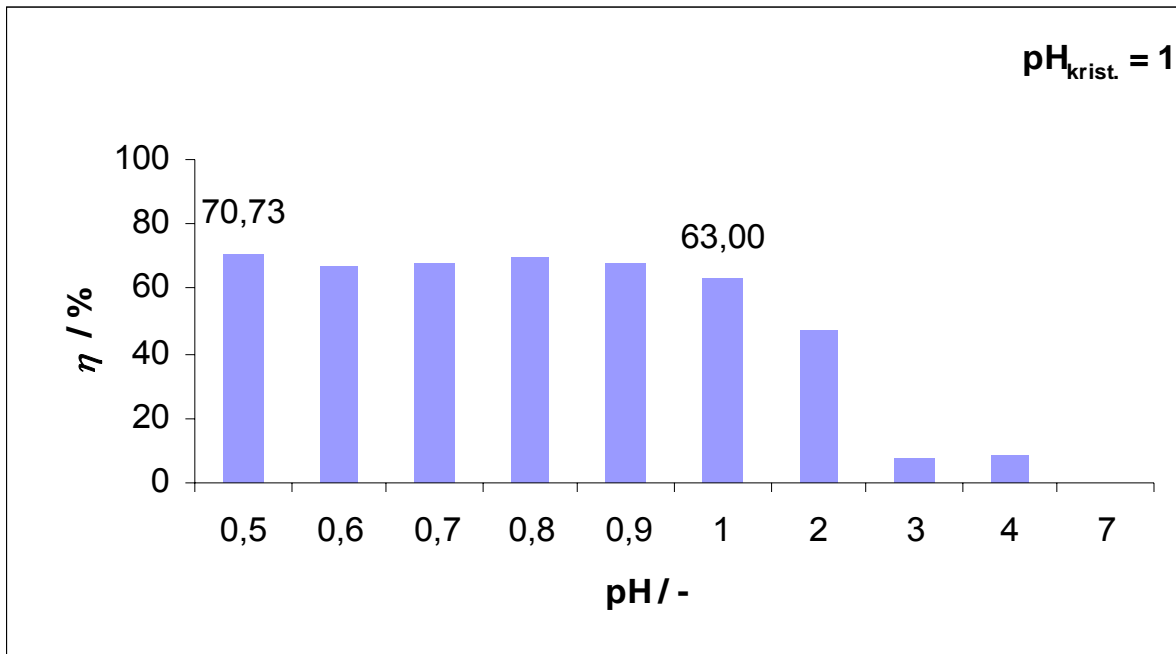
pH	η / %
7	0
3	16,52
2,5	28,17
2	54,7
1,9	60,78
1,8	57,04
1,7	65,83
1,6	66,7
1,5	68,78



Slika 4.10. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

Tablica 4.5. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

pH	η / %
7	0
4	8,18
3	7,36
2	46,91
1	63
0,9	67,64
0,8	69,54
0,7	68,36
0,6	67,45
0,5	70,73



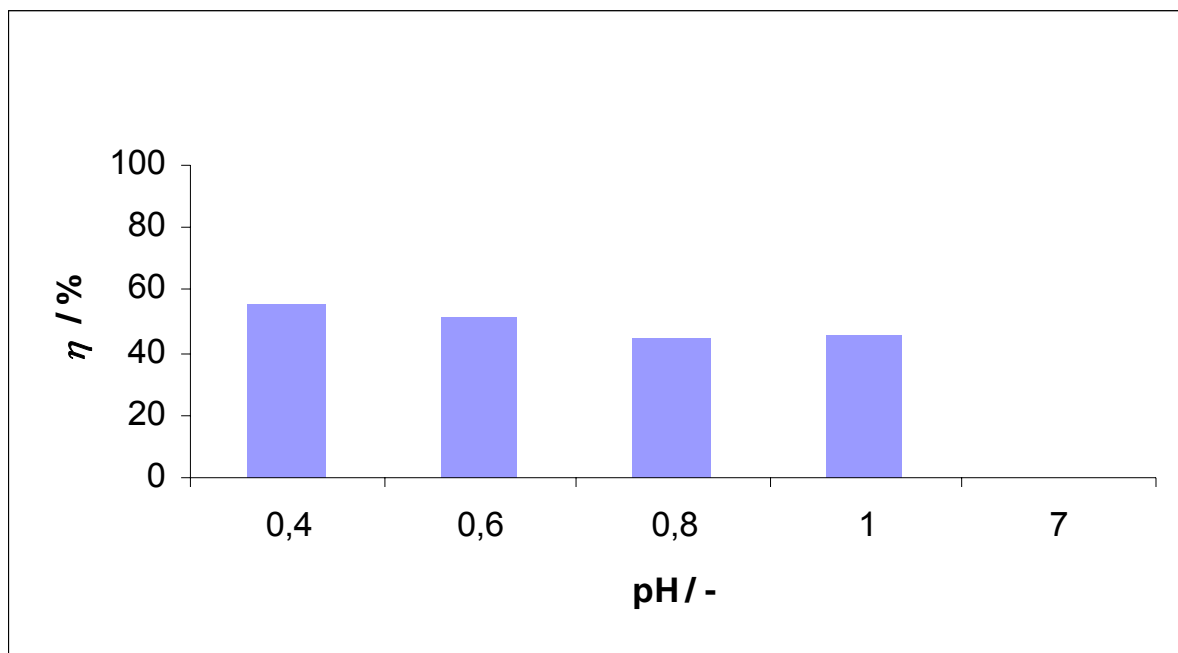
Slika 4.11. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

Najveće su učinkovitosti uočene kod procesa vođenih pri 30 i 25 $^\circ\text{C}$. Daljnji rast vrijednosti učinkovitosti nije uzrokovan smanjenjem pH već rastom kristala, procesom koji slijedi nakon nukleacije, pa nije potrebno dodavati H_2SO_4 nakon što je postignuta pH vrijednost kristalizacije da se poveća učinkovitost procesa.

Također je proučavan i utjecaj različitih koncentracija modelnih otopina fumarne kiseline na učinkovitost procesa kristalizacije pri čemu su analizirane otopine fumarne kiseline koncentracija: 50, 100, 150 i 200 mmol dm^{-3} . Modelna otopina fumarne kiseline koncentracije 50 mmol dm^{-3} nije kristalizirala., a najveća je učinkovitost pri pH kristalizacije uočena kod $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Tablica 4.6. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

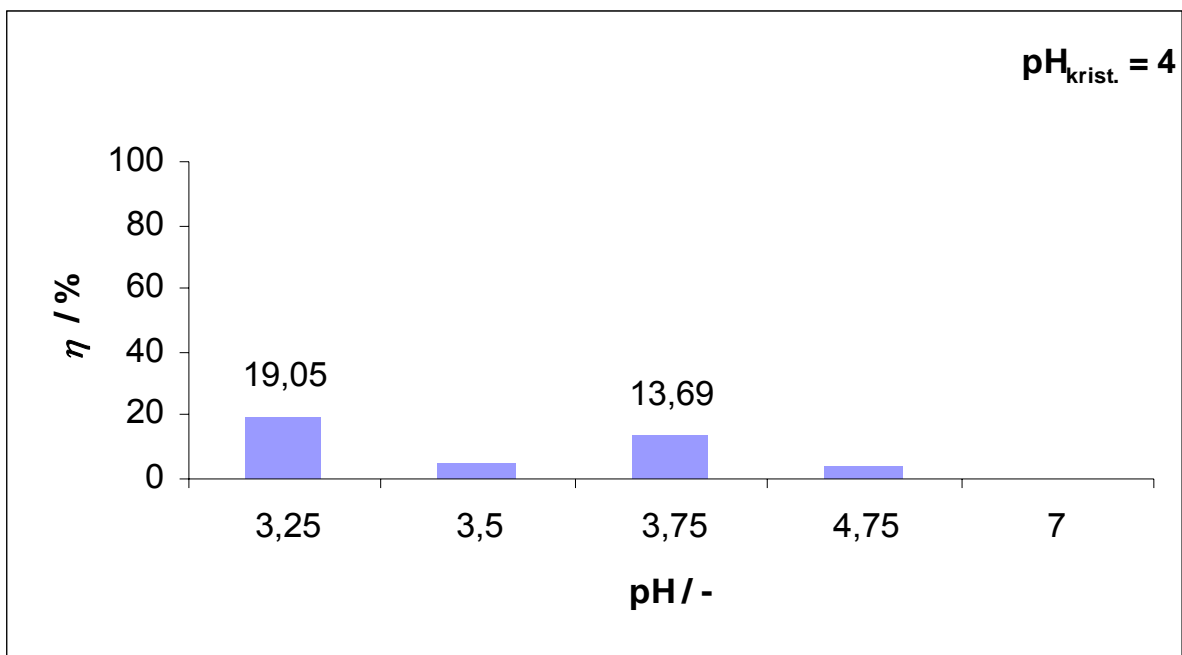
pH	$\eta / \%$
7	0
1	45,24
0,8	44,47
0,6	51,07
0,4	55,15



Slika 4.12. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

Tablica 4.7. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, na učinkovitost procesa.

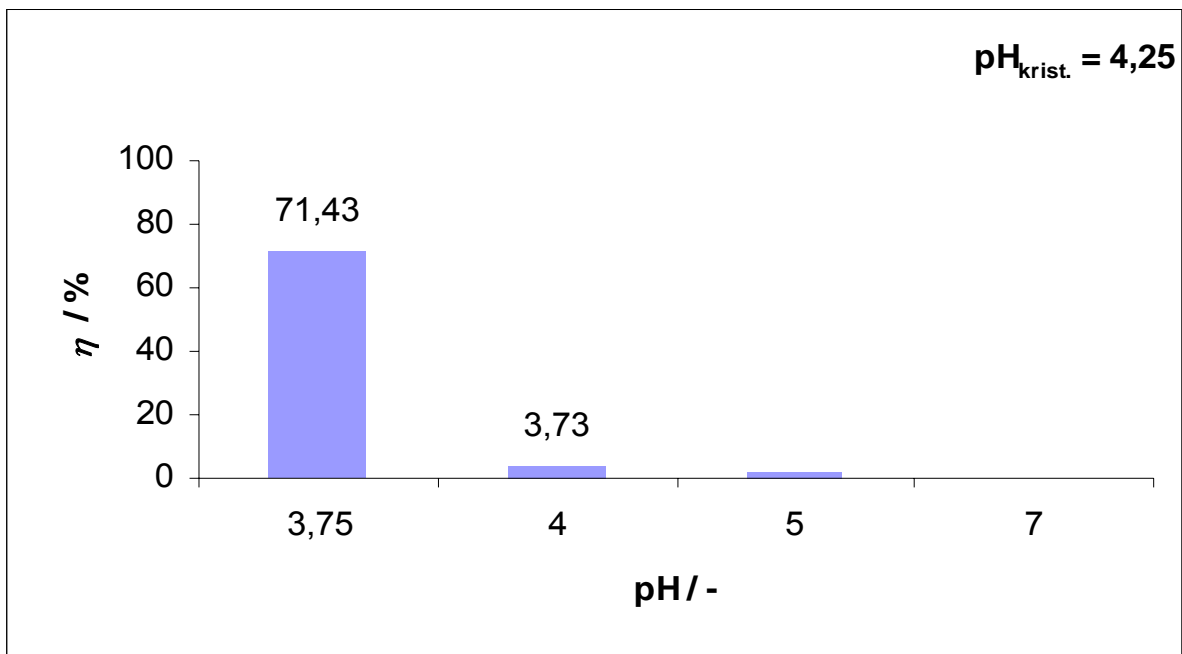
pH	$\eta / \%$
7	0
4,75	2,12
3,75	12,12
3,5	3,33
3,25	17,58



Slika 4.13. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

Tablica 4.8. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

pH	η /%
7	0
5	3,26
4	4,78
3,75	71,74

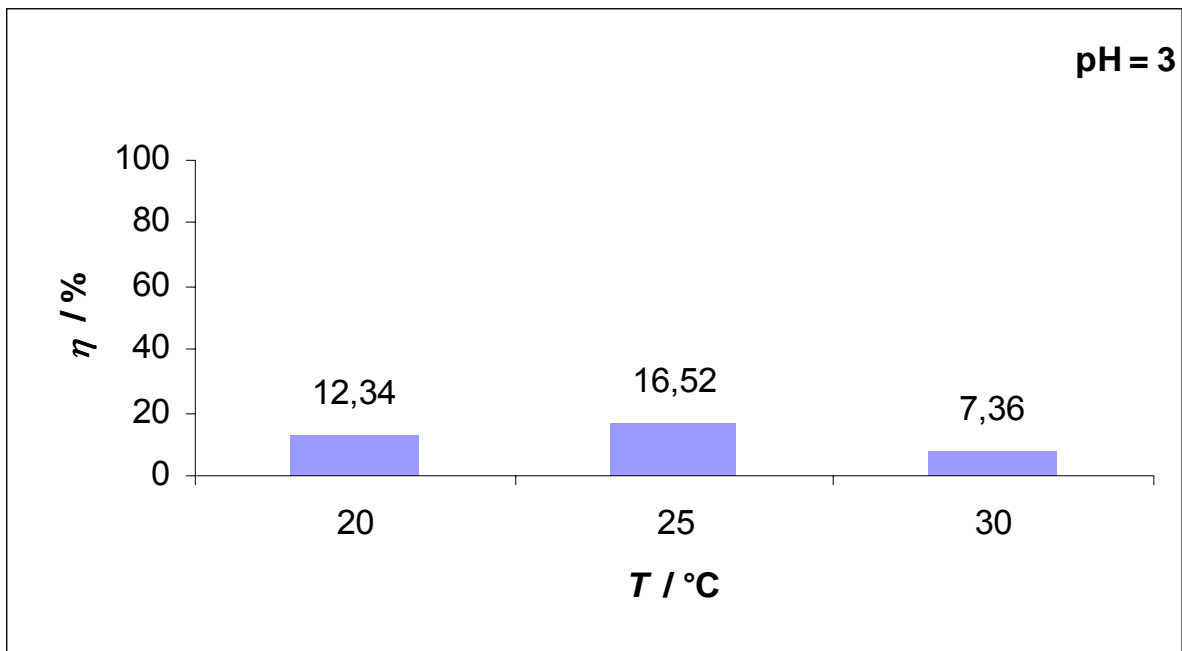


Slika 4.14. Utjecaj pH otopine fumarne kiseline $c = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

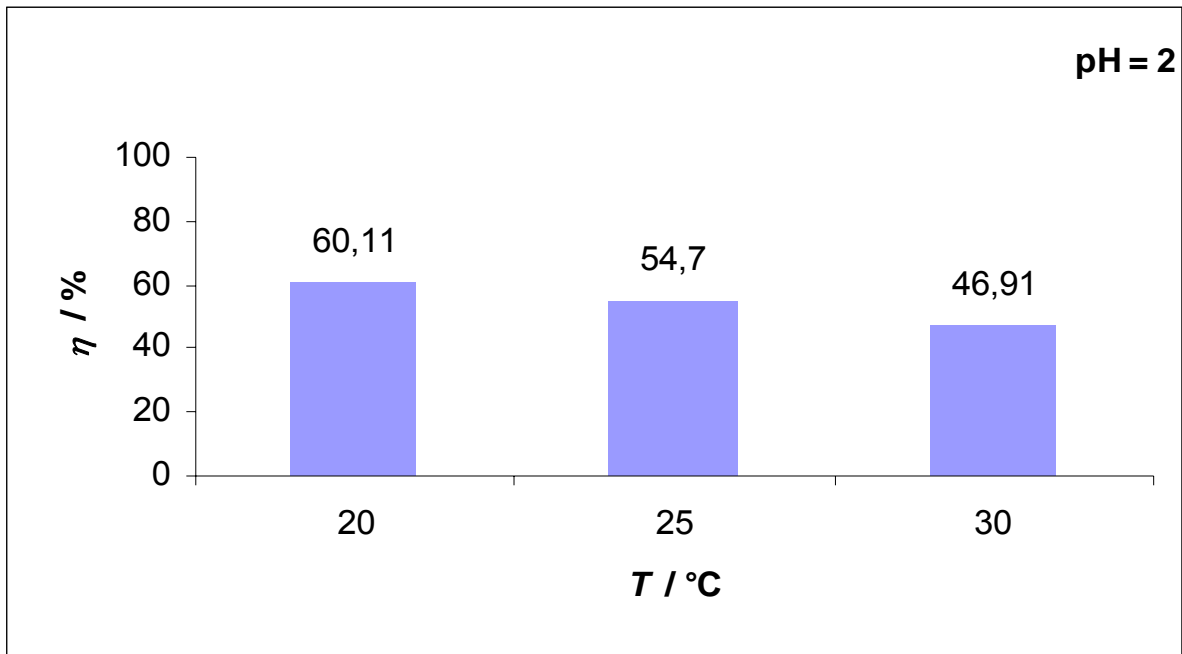
Prikazan je utjecaj različitih temperatura na učinkovitost kristalizacije modelnih otopina fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ za $\text{pH} = 2$ i $\text{pH} = 3$. Vidljivo je da su za sve tri temperature postignute male učinkovitosti procesa kristalizacije za $\text{pH} = 3$ dok su za $\text{pH} = 2$ postignute znatno veće učinkovitosti za sve tri temperature.

Tablica 4.9. Utjecaj temperature i pH otopine fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ na učinkovitost procesa kristalizacije.

$T / ^\circ\text{C}$	$\eta / \%$	
	$\text{pH} = 3$	$\text{pH} = 2$
20	12,34	60,11
25	16,52	54,70
30	7,36	46,91



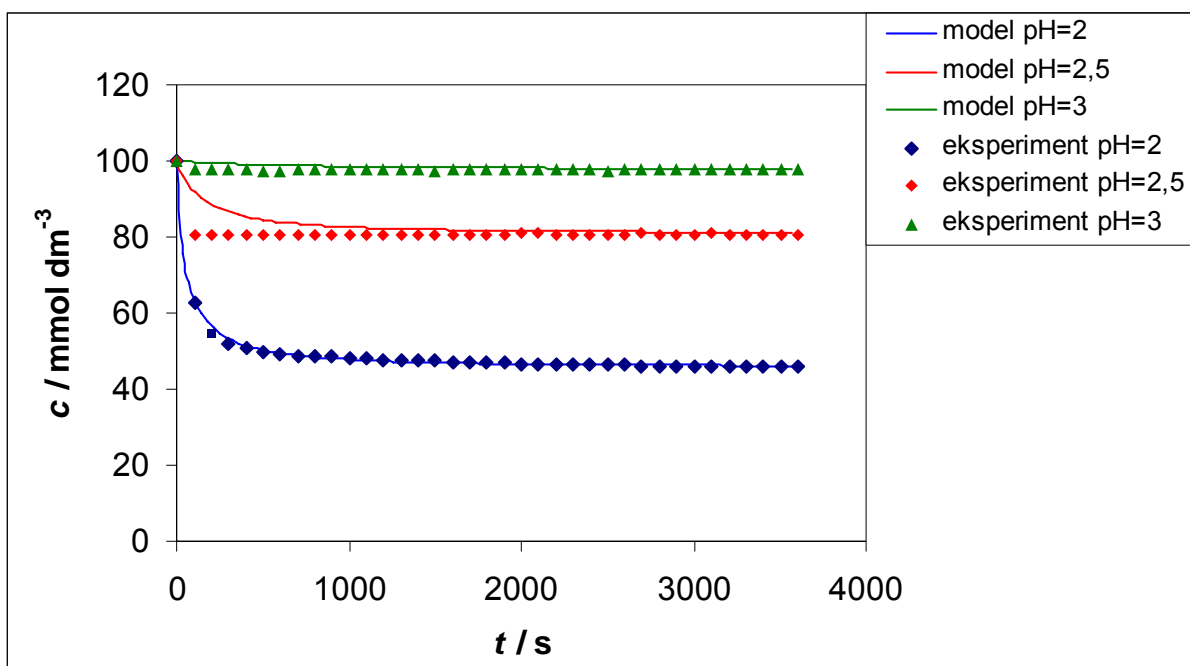
Slika 4.15. Promjena učinkovitosti procesa sa promjenom temperature otopine fumarne kiseline ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $\text{pH} = 3$).



Slika 4.16. Promjena učinkovitosti procesa sa promjenom temperature otopine fumarne kiseline ($c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $\text{pH} = 2$).

4.2. ODREĐIVANJE KINETIKE KRISTALIZACIJE U ŠARŽNOM KRISTALIZATORU

U šaržnom kristalizatoru je praćena dinamika procesa kristalizacije fumarne kiseline $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ i različitim pH vrijednostima otopine (pH = 2, 2,5, 3), u svrhu određivanja kinetike procesa kristalizacije. Eksperimentalno su određene ravnotežne koncentracije c^* (Slika 4.17., jednažba 3) za tri proučavane pH vrijednosti modelnih otopina fumarne kiseline.



Slika 4.17. Dinamika procesa kristalizacije fumarne kiseline u šaržnom kristalizatoru za različite pH vrijednosti.

Za otopinu fumarne kiseline pH = 2 procijenjeni su parametri modela procesa šaržne kristalizacije (jednažba 3) u programskom paketu Scientist. Dobivene su slijedeće vrijednosti parametara modela: $k_G = 0,02 \text{ s}^{-1}$ i $g = 1,76$. Rezultati simulacije procesa pomoću modela uspoređeni su sa eksperimentalnim rezultatima za svaki razmatrani pH te je dobiveno njihovo dobro slaganje. Treba napomenuti da model kvalitativno dobro opisuje proučavani proces. Za pH 2,5 i 3 modelne otopine fumarne kiseline model ne može zadovoljavajuće opisati samu dinamiku uspostavljanja ravnoteže. Procijenjena vrijednost konstante brzine kristalizacije k_G ,

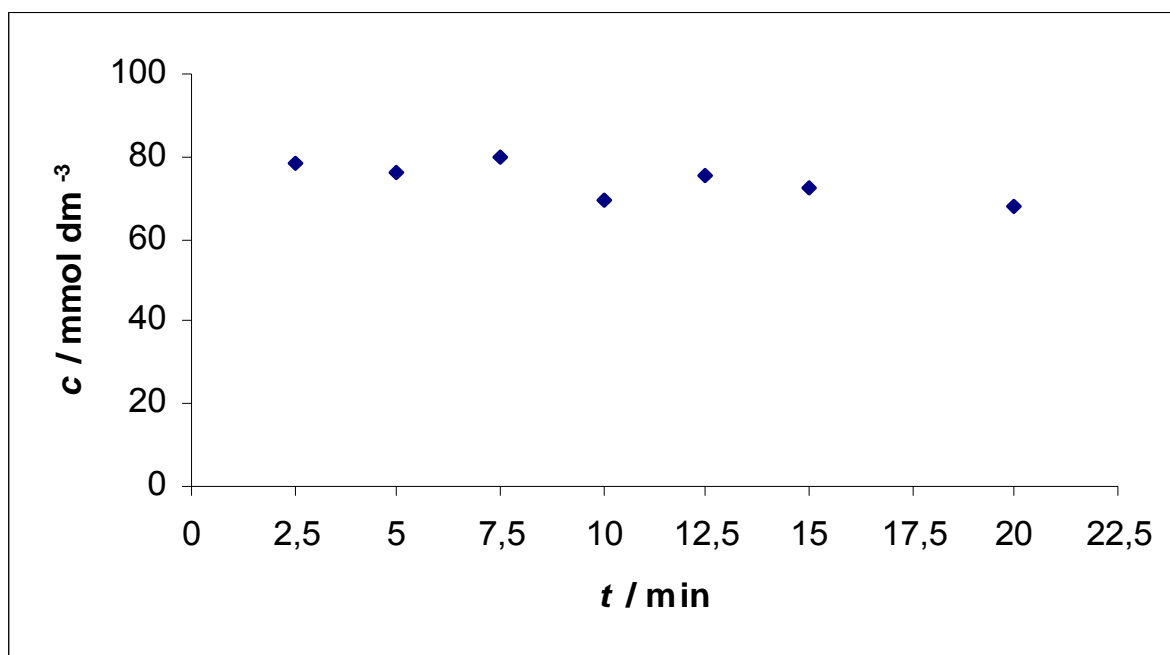
korištena je za proračun vremena zadržavanja modelne otopine fumarne kiseline u kontinuiranom kristalizadoru kao i za dizajn kontinuiranog kristalitora. Za svaki od provedenih pokusa proračunata je učinkovitost kristalizacije, te je ustanovljeno da ona raste sa smanjivanjem pH vrijednosti (Tablica 4.11.).

Tablica 4.10. Ovisnost učinkovitosti procesa kristalizacije o pH otopine fumarne kiseline za pokuse provedene u šaržnom kristalizadoru.

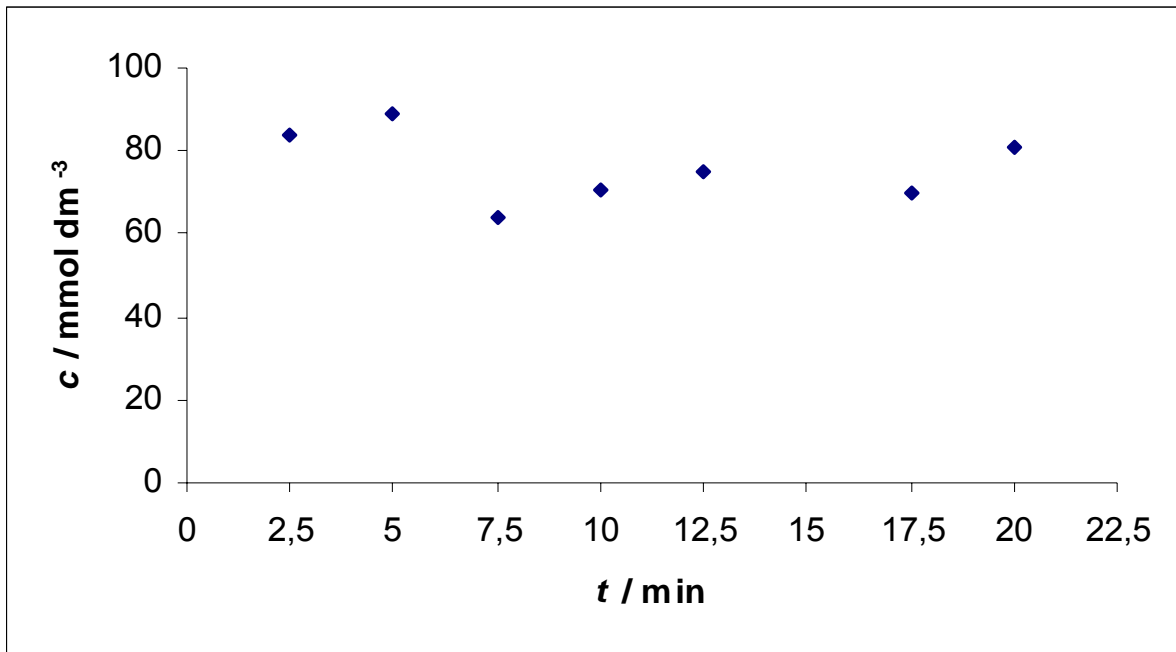
pH / -	η / %
2	54,36
2,5	19,37
3	2,53

4.3. KONTINUIRANA KRISTALIZACIJA

Na temelju rezultata pokusa provedenih u šaržnom kristalizatoru i procijenjene konstante brzine kristalizacije izračunato je vrijeme zadržavanja u kontinuiranom kristalizatoru, $\tau = 50$ s. Proveden je pokus za modelne otopine fumarne kiseline $\text{pH} = 2$, $c = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ pri temperaturi $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Praćena je promjena koncentracije u izlaznoj struji kapljevito ostataka (Slika 4.18.) i sedimenta (Slika 4.19.). Vidljivo je i povećanje koncentracije u sedimentu uz istovremeno smanjivanje koncentracije u kapljevito ostatku. Ostvarene je učinkovitost procesa kristalizacije od 14 % što je značajno smanjenje od onog postignutog u procesu šaržne kristalizacije (Tablica 4.9. i 4.11.). Razloge treba prije svega tražiti u pripremi uzorka za analizu na HPLC-u. Naime, kristali su otapani dodatkom KOH što je uzrokovalo povećanje volumena i smanjenje koncentracije fumarne kiseline u uzorku.



Slika 4.18. Promjena koncentracije fumarne kiseline u kapljevito ostatku pri $\text{pH} = 2$ tijekom provedbe procesa kontinuirane kristalizacije.



Slika 4.19. Promjena koncentracije fumarne kiseline u sedimentu pri $\text{pH} = 2$ tijekom provedbe procesa kontinuirane kristalizacije.

5. ZAKLJUČAK

Proveden je proces kristalizacije fumarne kiseline u šaržnom i kontinuiranom kristalizatoru. Eksperimentalno je određeno da L-jabučna kiselina ne kristalizira smanjenjem pH vrijednosti otopine što omogućuje selektivno razdvajanje smjese fumarne i jabučne kiseline. Za različite koncentracije modelnih otopina fumarne kiseline pri različitim temperaturama ispitan je utjecaj promjene pH na učinkovitost procesa kristalizacije. Dinamika rasta kristala praćena je u šaržnom kristalizatoru te su procijenjeni parametri modela procesa kristalizacije: $k_G = 0,02 \text{ s}^{-1}$ i $g = 1,76$. Na temelju procijenjene vrijednosti brzine kristalizacije u šaržnom kristalizatoru izračunato je vrijeme zadržavanja, $\tau = 50 \text{ s}$, i dizajniran proces kristalizacije u kontinuiranom kristalizatoru.

6. LITERATURA

1. **Harrison, Todd, Rudge, Petrides:** Bioseparations science and engineering, Oxford, 2003, str. 31-32, 272-277.
2. **Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.:** Microbiology, *McGraw-Hill*, 2000, str. 161, 554, 1006.
3. **Wang, X.;Gong, C.S.; Tsao, G.T.:** L-malic acid production from fumaric acid by a laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strain SHY2, *Bio. Letters*, **18** (1996) 1441, 1442.
4. **Marconi, W.; Faiola, F.; Piozzi, A.:** Catalytic activity of immobilized fumarase, *Journal of Molecular Catalysis*, **15** (2001) 93.
5. **Rosenberg, M.; Mikova, H.; Krištofikova, L.:** Formation of L-malic acid by yeastes of the genus *Dipodascus*, *Letters in Applied Microbiology*, **29** (1999.) 221.
6. **Oliveira, E.A.; Costa, A.A.R.; Figueiredo, Z.M.B.; Carvalho, L.B.:** L-Malic Acid Production by Entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into Polyacrylamide Gel Beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **47** (1994) 65,66.
7. **Belafi-Bako, K.; Nemestothy, N.; Gubicza, L.:** A study of applications of membrane techniques in bioconversion of fumaric acid to L-malic acid, *Desalination*, **162** (2004) 301-303.
8. **Figueiredo, Z.M.B.; Carvalho, L.B.:** L-Malic Acid Production Using Immobilized *Saccharomyces cerevisie*, *Applied Biochemistry and biotechnology*, **30** (1990) 217,218.
9. **Giorno, L.; Drioli, E.; Carvoli, G.;Cassano, A.; Donato, L.:** Study of an Enzyme Membrane Reactor with Immobilized Fumarase for Production of L-Malic Acid, *Biotechnology and Bioengineering*, **72** (2001) 77, 78.
10. **Sander, A.:** Toplinsko procesno inženjerstvo, predavanja, 2003/2004.
11. **Filipović I.; Lipanović S.:** Opća i anorganska kemija, I dio, Zagreb, 1991, str. 43.
12. **Roksa, I.:** Biokonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu cijelim stanicama m pekarskog kvasca, diplomski rad, Zagreb, 2005.

7. POPIS SIMBOLA

A	omjer površine kristala i volumena otapala, $m^2 dm^{-3}$
B	broj nukleusa formiranih u jedinici volumena i jedinici vremena, $m^{-3} h^{-1}$
\bar{B}	prosječna vrijednost nukleacije
c	koncentracija, $mmol dm^{-3}$ ili $g dm^{-3}$
c_i	koncentracija na granici faza između kapljevite i čvrste faze, $mmol dm^{-3}$ ili $g dm^{-3}$
c^*	koncentracija zasićenja, $mmol dm^{-3}$ ili $g dm^{-3}$
G	ukupni stupanj linearnog rasta
\bar{G}	prosječna vrijednost stupnja rasta
k_d, k_r	koeficijenti prijenosa mase, h^{-1}
k_G	ukupni koeficijent prijenosa mase, h^{-1}
k_I	konstanta, h^{-1}
k_n	konstanta nukleacije, h^{-1}
L	jedna od karakterističnih dimenzija kristala, npr. duljina, m
M_T	gustoća suspenzije, $g dm^{-3}$
N	broj nukleusa u jedinici volumena, m^{-3}
q	protok, $cm^3 min^{-1}$
R	stupanj depozicije mase tijekom rasta kristala
t	vrijeme, s ili min
T	temperatura, $^{\circ}C$
τ	vrijeme zadržavanja, s^{-1}
W	masa kristala po volumenu otapala, $kg m^{-3}$
λ	valna duljina, nm

8. PRILOG

PRILOG 1.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-jabučne kiseline.

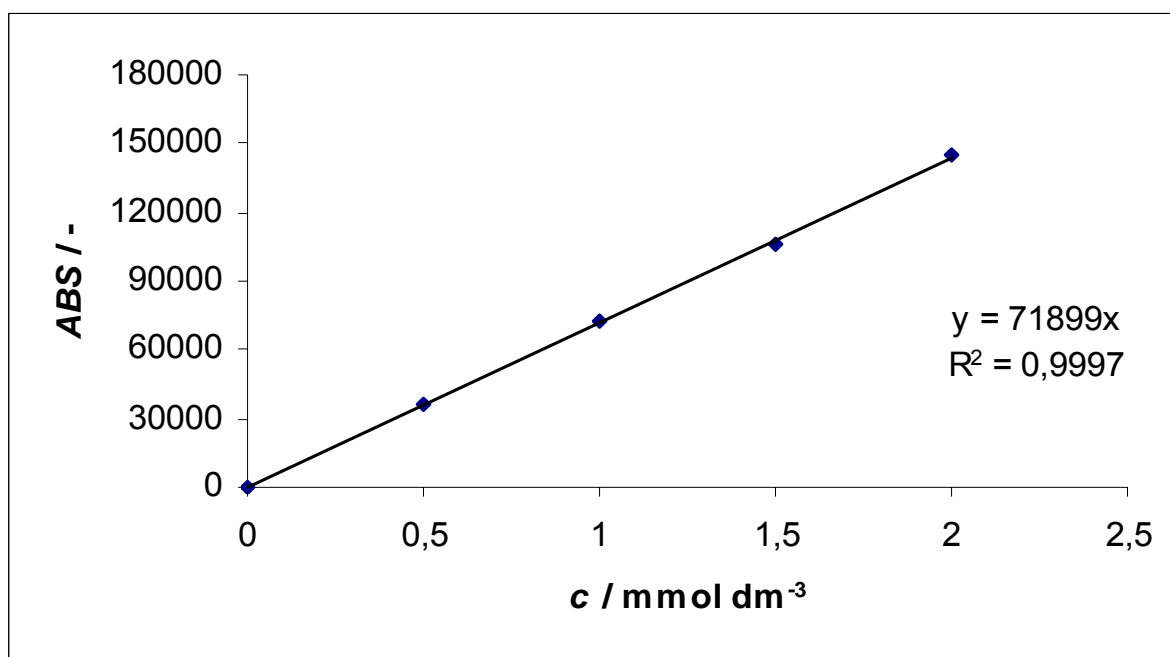
PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije fumarne kiseline.

PRILOG 3.: Kalibracija pumpe za smjesu L-jabučne i fumarne kiseline.

PRILOG 4.: Kalibracija pumpe za L-jabučnu kiselinu.

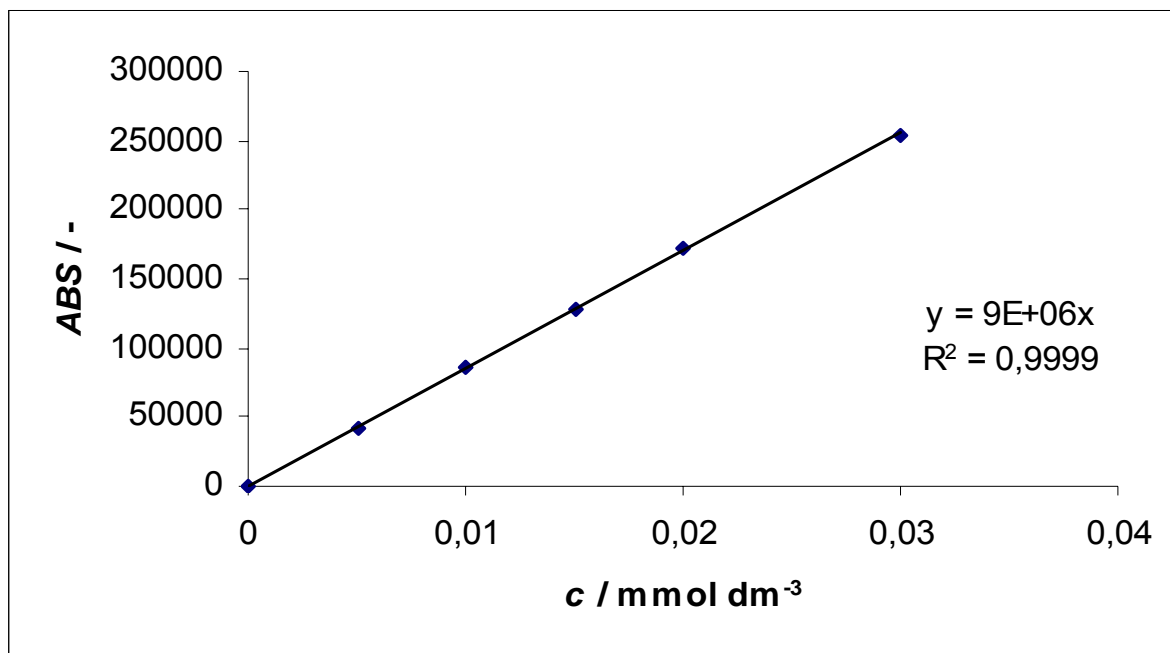
PRILOG 5.: Kalibracija pumpe za fumarnu kiselinu.

PRILOG 1.



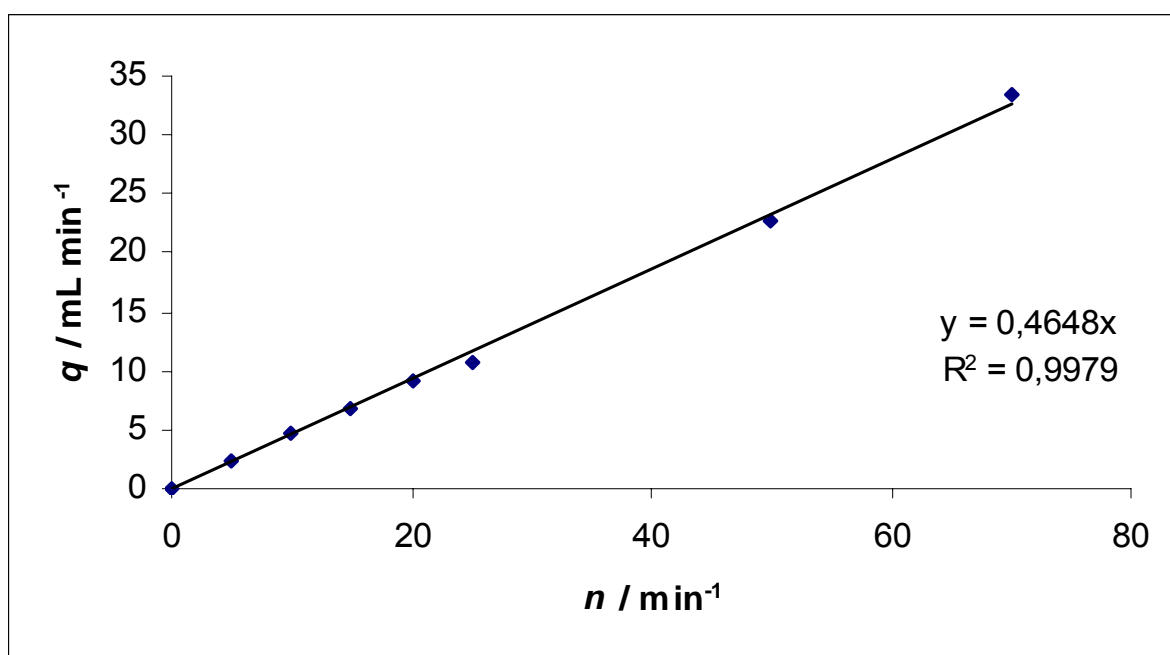
Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-jabučne kiseline.

PRILOG 2.



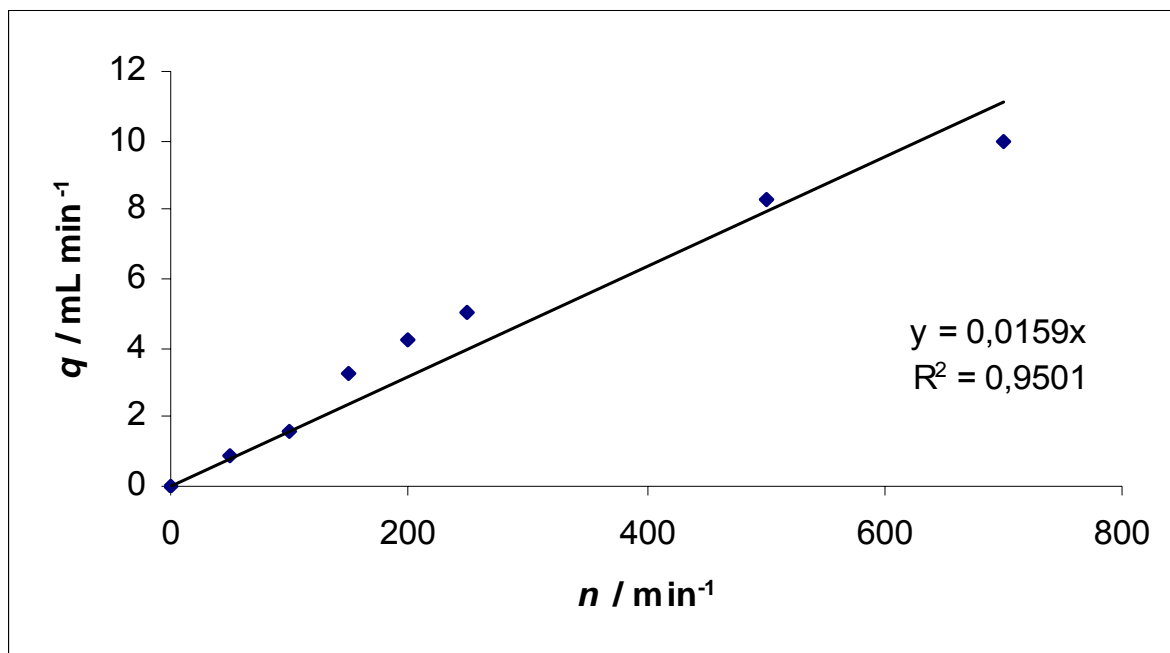
Slika 8.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fumarne kiseline.

PRILOG 3.



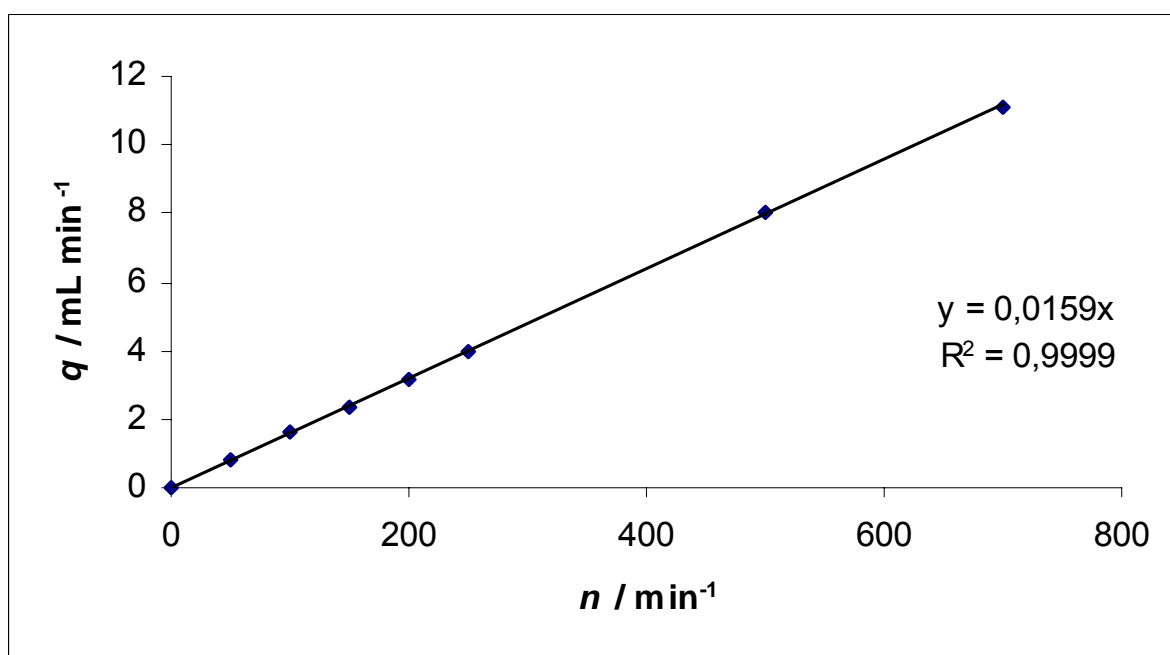
Slika 8.3. Kalibracija pumpe za smjesu L-jabučne i fumarne kiseline.

PRILOG 4.



Slika 8.4. Kalibracija pumpe za L-jabučnu kiselinu.

PRILOG 5.



Slika 8.5. Kalibracija pumpe za fumarnu kiselinu.

