

On-line mjerenje koncentracije biodizela u mikrosustavima

Fiala, Emanuel-Nino

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:569678>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE SVEUČILIŠNI
PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Emanuel-Nino Fiala

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE SVEUČILIŠNI
PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Emanuel-Nino Fiala

ON-LINE MJERENJE KONCENTRACIJE BIODIZELA U MIKROSUSTAVIMA
ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: dr. sc. Anita Šalić

Neposredni voditelji: Martin Gojun, mag. ing. oecoing., doc. dr. sc. Davor Valinger

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. dr. sc. Anita Šalić
2. prof. dr. sc. Buno Zelić
3. doc. dr. sc. Davor Valinger

Zagreb, rujan 2020.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Aniti Šalić na mentorstvu, pruženoj prilici za upoznavanje rada u laboratoriju i strpljenju prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala Martinu Gojunu, mag. ing. oecoiing, na neposrednom vodstvu, brojnim savjetima, pomoći u radu te odgovoru na svako moje pitanje.

Želim se zahvaliti doc. dr. sc. Davoru Valingeru s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu koji me upoznao s radom NIR spektrometra na kojem sam i odradio eksperimentalni dio ovog rada.

Hvala mojim roditeljima i braći koji su mi pružili podršku i ljubav na svakoj stepenici mog života i hvala prijateljima koji su svaku brigu učinili lakšom.

U konačnici, hvala mojoj djevojci na strpljenju, pruženoj ljubavi i što mi je najveća potpora u životu.

SAŽETAK

Kako su količine fosilnih goriva ograničene, a sama goriva štetna za okoliš, preporuča se prelazak na obnovljive izvore energije, između kojih je i biodizel. Biodizel je danas sve popularnije gorivo zbog svoje biorazgradivosti, niske emisije štetnih plinova, manjeg zagađenja okoliša i netoksičnosti. Najčešće se proizvodnja biodizela odvija procesom transesterifikacije raznih ulja i masti uz metanol u kotlastim reaktorima te uz prisustvo kiselina, lužina ili enzima kao katalizatora. Cilj proizvodnje je dobiti što čišći primarni produkt, koji se može odmah koristiti kao gorivo sa što manje nusprodukta kako bi se izbjegli često vrlo skupi procesi pročišćavanja. Kako bi proces proizvodnje bio što uspješniji, potrebno je kontinuirano pratiti i analizirati produkte reakcije. Iako već postoje razne metode analize biodizela i glicerola, svakodnevno se istražuju nove metode čiji je glavni cilj da budu što jednostavnije, preciznije i brže.

U ovom radu, biodizel je sintetiziran enzimatski kataliziranom transesterifikacijom korištenjem suncokretovog ulja i metanola kao supstrata. Tijekom procesa praćena je koncentracija nastalog glicerola kao jednog od pokazatelja uspješnosti procesa. Prvo je određena koncentracije estera masnih kiselina – biodizela plinskom kromatografijom na temelju čega je iz stehiometrije reakcije transesterifikacije izračunata teoretska koncentracija nastalog glicerola. Izračunata koncentracija glicerola je uspoređena s koncentracijom glicerola dobivenom analizom standardnim postupcima na UV-VIS spektrofotometru i plinskom kromatografu. Kako niti jedna od metoda nije dala zadovoljavajuće rezultate tj. obje analize pokazale su značajna odstupanja od teorijske vrijednosti koncentracije glicerola, kao zamjenska analitička metoda provedena je analiza na NIR spektrometru. Analiza na NIR spektrometru je provedena na dva načina, *off-line* iz uzorka prikupljenih tijekom provedbe procesa transesterifikacije te *on-line* na način da se koncentracija glicerola određivala kontinuirano prolaskom reakcijske smjese kroz protočnu kivetu NIR spektrometra. Od svih analiziranih metoda mjerenja koncentracije glicerola, NIR spektroskopija je pokazala najveće podudaranje s teoretskom, izračunatom koncentracijom glicerola.

Ključne riječi: biodizel, transesterifikacija, glicerol, UV-VIS spektrofotometar, plinski kromatograf, NIR spektrometar

SUMMARY

As the amount of fossil fuels is limited and the fuel itself is harmful to the environment, it is recommended to switch to renewable energy sources, including biodiesel. Biodiesel is an increasingly popular fuel today due to its biodegradability, low emissions, less environmental pollution and non-toxicity. Most often, the production of biodiesel takes place by the process of transesterification of various oils and fats with methanol in batch reactors, with the addition of acids, bases or enzymes as catalysts. The goal of production is to get the primary product as pure as possible, which can be used immediately as a fuel with small amount of by-products as possible in order to avoid often very expensive purification processes. To make production process as successful as possible, it is necessary to continuously monitor and analyse the reaction products during the process. Although there are already various methods of analysis of biodiesel and glycerol, new methods are being researched every day, the main goal of which is to be as simple, precise and fast as possible.

In this work biodiesel was synthesized by enzymatically catalysed transesterification using sunflower oil and methanol as substrates. During the process, the concentration of glycerol, as one of the indicators of the success of the process, was monitored. At the very beginning, an analysis of the fatty acid esters concentration using gas chromatography was performed from which the theoretical value of the glycerol concentration was calculated. The calculated glycerol concentration was compared with the glycerol concentration obtained by analysis using standard methods on a UV-VIS spectrophotometer and by the gas chromatography. Because neither of the methods gave satisfactory results, meaning both analyses showed significant deviations from the theoretical value of glycerol, the analysis on NIR spectrometer was proposed. During the synthesis reaction, the analysis of biodiesel concentration was performed in such a way that samples were taken at certain time intervals for the *off-line* analysis and *on-line* in such a way that the concentration was determined continuously by screening the reaction mixture which was passing through a flow cell of the NIR spectrometer. The NIR spectroscopy method proved to be the best, with the greatest agreement of the measured glycerol concentration with the theoretically calculated concentration.

Keywords: biodiesel, transesterification, glycerol, UV-VIS spectrophotometer, gas chromatograph, NIR spectrometer

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Biodizel	3
2.1.1. Prednosti biodizela	4
2.1.2. Nedostaci biodizela	4
2.1.3. Postupci proizvodnje biodizela.....	4
2.2. Transesterifikacija	5
2.2.1. Nekatalitička transesterifikacija	6
2.2.2. Katalitička transesterifikacija	6
2.3. Vrste reaktora u proizvodnji biodizela	9
2.3.1. Kotlasti reaktor	9
2.3.2. Cijevni reaktor	10
2.4. Analitičke metode ispitivanja biodizela	10
2.4.1. Spektrofotometrija.....	11
2.4.2. Plinska kromatografija.....	11
2.4.3. NIR spektroskopija.....	11
2.4.4. Kemometrija.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Oprema	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Proizvodnja biodizela u kotlastom reaktoru	15
3.2.3. Proizvodnja biodizela u mikroreaktoru	16
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glicerola	16
3.2.4. Određivanje koncentracije glicerola i biodizela plinskom kromatografijom	18
3.2.5. Određivanje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru.....	20
4.2. NIR spektroskopija.....	21
4.3. Usporedba <i>off-line</i> NIR spektroskopije sa standardnim analitičkim metodama	25
4.4. <i>On-line</i> mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru	26

5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29
7. PRILOZI.....	32

1. UVOD

U suvremenom svijetu sve je zastupljenija upotreba fosilnih goriva. Fosilna goriva spadaju u neobnovljive izvore energije, a čine ih ugljen, nafta i prirodni plin.¹ Zalihe svih navedenih goriva su ograničene.

Proces pretvorbe kemijske energije iz one koja je sadržana u gorivima u toplinsku energiju odvija se uz obavljanje mehaničkog rada. Takav proces naziva se izgaranje. Izgaranje goriva odvija se unutar motora pri čemu nastaju dimni plinovi. Dimni plinovi najčešće sadrže ugljikov dioksid, sumporov dioksid i spojeve s dušikovim oksidima. Upravo je ugljikov dioksid jedan od najvećih uzročnika globalnog zagrijavanja i najzastupljeniji staklenički plin.²

Kako bi se smanjilo globalno zagrijavanje preporuča se korištenje obnovljivih izvora energije. Sukladno hrvatskom zakonodavnom okviru, odnosno Zakonu o energiji „*Obnovljivi izvori energije su izvori energije koji su sačuvani u prirodi i obnavljaju se u cijelosti ili djelomično, posebno energija vodotoka, vjetra, ne akumulirana sunčeva energija, biodizel, biomasa, bioplin, geotermalna energija itd.*“³

Čista biljna ulja koristila su se kao prva biogoriva tj. Kao zamjena za naftna goriva. Međutim, njihova upotreba je vrlo brzo prekinuta jer se pokazalo da upotreba čistih biljnih ulja uzrokuje probleme u radu motora tj. njihova upotreba dovodi do začepjenja motora. Začepjenja su uzrokovana velikom viskoznošću ulja i posljedično njihovim taloženjem, a kao dodatan problem se pojavljivala i oksidacija.⁴

Zbog svega toga, bilo je potrebno proizvesti neki drugi oblik goriva s boljim svojstvima. Biodizel tj. esteri masnih kiselina i nižih alkohola, pokazala su se kao obećavajuće rješenje. U industriji se proizvodnja biodizela odvija u kotlastim reaktorima uz prisustvo katalizatora. Najčešće se provodi bazno-katalizirana transesterifikacija jer je oko četiri tisuće puta brža od kiselo-katalizirane.⁵ Ipak, bez obzira na način proizvodnje, troškovi proizvodnje biodizela su i dalje visoki što posljedično utječe na samu cijenu konačnog proizvoda.

Važno je pratiti tijek procesa proizvodnje biodizela kako bi se u konačnici dobio proizvod koji zadovoljava tržišne uvjete. Ključni parametri procesa proizvodnje biodizela su udio estera masnih kiselina i slobodnog glicerola. Danas postoje standardne metode za praćenje kvalitete biodizela na uređajima poput UV-VIS spektrofotometra i plinskog kromatografa. Njihov glavni nedostatak je što ne daju pravu informaciju o procesu u realnom vremenu jer priprema uzoraka za analizu te sama analiza zahtijevaju dosta vremena.

Zbog svega toga danas se sve više radi na razvoju novih metoda i tehnika koje će omogućiti da se u realnom vremenu dobiju ponovljive i pouzdane informaciju o procesu.

Cilj ovog završnog rada je ispitati mogućnost upotrebe NIR (engl. *Near Infra Red*) spektroskopije kao učinkovite metode praćenja glicerola tijekom procesa proizvodnje biodizela. Glavna prednost NIR-a je što ne zahtjeva posebnu pripremu uzoraka te na taj način skraćuje vrijeme analize i ubrzava proces mjerenja.⁶ Kako bi se usporedile različite analitičke metode za mjerenje koncentracije glicerola, plinska kromatografija, UV-VIS spektrofotometrija i NIR spektroskopija, proveden je proces sinteze biodizela transesterifikacijom jestivog suncokretovog ulja kataliziran enzimom lipaza u kotlastom reaktoru volumena 500 mL i u mikroreaktoru volumena 236 μ L. Dobiveni rezultati su uspoređeni s teoretskom, izračunatom koncentracijom glicerola određenom temeljem stehiometrije reakcije transesterifikacije i izmjerene koncentracije estera masnih kiselina, odnosno biodizela.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biodizel

Biodizel spada u skupinu goriva koja su dobivena iz obnovljivih izvora energije, najčešće ulja ili masti biljnog i životinjskog porijekla. Masti i ulja pripadaju skupini lipida u čijem sastavu prevladavaju trigliceridi – esteri glicerola i masnih kiselina. Masne kiseline dijele se na zasićene (karakteristična je jednostruka ugljikova veza) i nezasićene (karakteristična je dvostruka veza) kiseline. U mastima koje su u krutom stanju prevladavaju zasićene masne kiseline dok u uljima koja su u kapljevitom agregatnom stanju prevladavaju nezasićene masne kiseline.⁷ Najčešće se biodizel dobiva iz poljoprivrednih kultura poput uljane repice, suncokreta i drugih biljnih ulja jer kao krutina nije pogodan za izgaranje u dizelskim motorima.

Biodizel je poznat i pod skraćenicama FAEE, FAME, FABE. Od ovih biodizela najčešće se postupkom transesterifikacije proizvodi FAME (engl. *Fatty Acids Methyl Esters*) tj. metilni esteri masnih kiselina.⁸ Kako se biodizel može dobiti iz više biljnih ulja, njegova svojstva, karakteristike i kvaliteta ovise o tome od kojih je masnih kiselina (i u kojem omjeru) sastavljeno ulje iz kojeg se dobiva. Različita ulja rezultiraju različitom strukturom estera koji direktno mijenjaju svojstva biodizela. Najbitnija svojstva biodizela su toplinske značajke, viskoznost, mazivost te cetanski broj koji služi kao mjerilo kakvoće dizelskog goriva tj. služi za usporedbu točke paljenja s ispitanim dizelskim gorivom.⁴

U ovom radu je kao reaktant u procesu proizvodnje biodizela korišteno suncokretovo ulje koje sadrži najveći udio palmitinske i stearinske masne kiseline kao predstavnike zasićenih masnih kiselina te oleinske, linoleinske i linolne masne kiseline kao predstavnike nezasićenih masnih kiselina. Ostale masne kiseline poput miristinske su u suncokretovom ulju zastupljene s manjim udjelima.⁹

Po kemijskom sastavu biodizel je monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina podrijetlom iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla. Ovo je šira definicija koju navodi američka norma ASTM D 6751¹⁰, dok europska norma EN 14214¹¹ te hrvatska norma¹² i Uredba o kakvoći biogoriva¹³ definiraju biodizel kao metilni ester masnih kiselina.¹⁴ Kako je vidljivo iz ovih definicija, metanol je najčešći izbor alkohola u reakciji transesterifikacije i to prvenstveno zbog niske cijene i lakše dostupnosti u odnosu na primjerice propanol i butanol.

2.1.1. Prednosti biodizela

Sirovine za proizvodnju biodizela su obnovljive i manje pridonose globalnom zatopljenju. Ispušni plinovi nakon izgaranja biodizela sadrže manju koncentraciju ugljikovog monoksida, nesagorivih ugljikovodika, čvrstih čestica, policikličkih aromata i sastojaka koji su otrovni.⁴

Kada se u fosilno gorivo umiješa biodizel u volumnom udjelu 1-5%, poboljšava se njegova mazivost. Biodizel se bolje razgrađuje od ulja iz kojeg se proizvodi, a puno je manje štetan od fosilnog dizela. Velika prednost biodizela je njegova viša temperatura plamišta (iznad 100°C) nad fosilnim dizelom (iznad 55°C) te je tako sigurniji za skladištenje i rukovanje.¹⁴

Prednost proizvodnje biodizela je i u tome da se tijekom proizvodnje većinom koriste otpadna ulja i masti, pa se ne mora voditi dodatna briga o njihovom odlaganju. Jako bitan čimbenik je i to što se proizvodnjom biodizela smanjuje ovisnost o uvozu nafte, jer mnoge zemlje nemaju pristup vlastitim nalazištima nafte.¹⁶

2.1.2. Nedostaci biodizela

Biodizel u odnosu na fosilni dizel ima manji sadržaj energije, tj. za isti obujam oba goriva, iz motora na biodizel dobit će se 8,7% manje snage. Također, kod sagorijevanja biodizela u motoru nastaje veća količina dušikovih oksida NO_x u dimnim plinovima.^{14,16}

U odnosu na fosilni dizel, biodizel ima višu temperaturu tečenja i staništa (temperatura pri kojoj ulje gubi pokretljivost) pa to može biti problem u hladnijim mjesecima u godini.¹⁶ Problemi kod stajanja i skladištenja biodizela su oksidacijski procesi koji mogu ometati ubrizgavanje goriva u motor, a može doći i do začepjenja različitih filtara zbog nastajanja kristalića estera masnih kiselina pri nižim temperaturama. Uz ovo nedovoljan je broj izvora otpadnih masti i ulja potrebnih za proizvodnju biodizela, kako bi se njegovom primjenom uspio zamijeniti fosilni dizel. Dodatno, proizvodnja biljnih ulja je manja od potreba tržišta pa dolazi do rasta cijena sirovina.¹⁴

Biodizel je dobro otapalo pa može nepovoljno utjecati na gumu i lakove, tj. na materijale od kojih su napravljene cijevi. Posjeduje redukcijska svojstva pa je potrebno izbjegavati kontakt biodizela s nekim metalima: broncom, olovom, bakrom, kositrom i cinkom.¹⁴

2.1.3. Postupci proizvodnje biodizela

Cilj procesa proizvodnje biodizela je prevesti biljna ulja i masti u oblik koji se može koristiti kao gorivo. Bitno je da na taj način proizvedeno gorivo ima slična svojstva kao dizel

te da ima što je moguće manji štetan utjecajna okoliš. Proizvodnja biodizela može se odvijati pirolizom, mikroemulzifikacijom, i transesterifikacijom kao glavnim industrijskim procesima proizvodnje biodizela. U pravilu se biodizel koristi kao smjesa s fosilnim dizelom.¹⁵

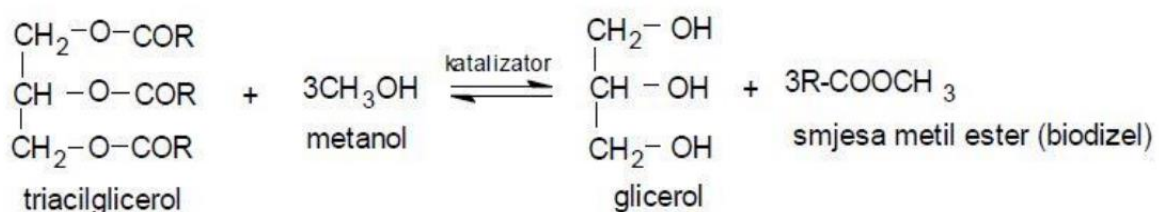
Piroliza ili toplinsko krekiranje je toplinski proces kojim se ulje pretvara u biodizel na način da se toplinski razgrađuje pri visokim temperaturama (za ulje 300 – 500°C) bez prisutnosti kisika. Proces je skup, a pirolizom nastaju i produkti čija primjenska svojstva nisu zadovoljavajuća. Najveći problem pirolize je što je kapljeviti produkt ovog procesa sličan benzenu (uz nastajanje većeg broja neželjenih produkata) koji sadrži sumpor što na ovaj način dobiveni biodizel čini manje ekološkim prihvatljivim.¹⁷

Mikroemulzifikacija je proces proizvodnje biodizela koja se provodi na način da se biljna ulja miješaju s metanolom ili etanolom i tvarima koje snižavaju površinsku napetost, tj. tenzidima.¹⁵ Ovim postupkom nastaje disperzija dviju ili više nemješljivih faza. Na taj se način ranije pokušao riješiti problem viskoznosti biljnih ulja pri njihovoj direktnoj upotrebi kao goriva. Međutim ,mikroemulzifikacijom nisu riješeni problemi nepotpunog sagorijevanja i nastajanja naslaga koksa u unutrašnjosti motora.

2.2. Transesterifikacija

Transesterifikacija je najzastupljeniji i najrazvijeniji industrijski proces proizvodnje biodizela. U ovom procesu dolazi do razlaganja pomoću alkohola pa se taj postupak često naziva i alkoholiza. Reakcija je reverzibilna, a povratna reakcija je hidroliza estera masnih kiselina.¹⁸

Pod pojmom transesterifikacije (Slika 1.) podrazumijeva se proces pri kojem se iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla (višemasnih kiselina) i alkohola (primjerice metanola) dobivaju esteri višemasnih kiselina (kao primarni produkt) i glicerol (kao nusprodukti reakcije).¹⁹



Slika 1. Reakcija transesterifikacije

Prije upotrebe biodizela dobivenog procesom transesterifikacije potrebno je ukloniti nusprodukte koji nastaju reakcijom, neiskorištene reaktante i katalizator što proces čini skupljim. Što je skuplji proces dobivanja biodizela te cijena sirovina, to je krajnja cijena biodizela kao gotovog proizvoda veća.¹⁷ Glavni čimbenici koji utječu na iskorištenje reakcije transesterifikacije su količina alkohola, temperatura reakcije i koncentracija katalizatora.

U industriji se u procesu sinteze biodizela najčešće koristi metanol zbog svoje cijene. Iz tog razloga, a kada se govori o biodizelu, uglavnom se misli o metilnom esteru masnih kiselina. Dodatni razlog upotrebe metanola u procesu transesterifikacije su dobre karakteristike dobivenog produkta.¹⁵

Transesterifikacija se s obzirom na način provedbe u najširem smislu dijeli na nekatalitičku i katalitičku.

2.2.1. Nekatalitička transesterifikacija

U procesu nekatalitičke transesterifikacije ne koristi se tj. proces transesterifikacije se odvija neposrednom reakcijom između ulja/masti i alkohola. Reakcija je vrlo spora, a povišenjem temperature iznad 200°C i provođenjem reakcije u duljem vremenskom periodu (više sati) ostvaruje se primjetna konverzija.¹⁴

Do ubrzanja nekatalitičke transesterifikacije dolazi kada se koristi metanol u superkritičnom stanju. U tom stanju fluid se smatra plinom iako je mnogo gušći, tj. ima svojstva između plina i kapljevine. Kritična točka metanola je na temperaturi od 239°C pri tlaku 8,09MPa. Pri tim uvjetima metanol ima manju dielektričnu konstantu što rezultira nastankom jednofaznog sustava ulje/alkohol što uz povišenu temperaturu sustava rezultira nastankom biodizela već za nekoliko minuta.¹⁴

Kako bi se postigla značajnija konverzija, ova reakcija se mora provoditi na temperaturama između 350 i 400°C. Daljnje povećanje temperature ima za posljedicu temperaturni raspad dobivenih estera.¹⁹ Iako u ovom procesu nije potrebna separacija produkata, a za visoko iskorištenje nije potreban katalizator, proces nije isplativ zbog velike potrošnje energije povezane s visokim temperaturama na kojima se provodi.

2.2.2. Katalitička transesterifikacija

Pri nižim temperaturama (20 do 60°C) reakcija triglicerida masnih kiselina i alkohola se praktički ne odvija.¹⁵ Kako bi došlo do kemijske reakcije, potrebno je dovesti molekule

reakcijske smjese do sudara. Kinetička energija molekula mora biti dovoljno velika kako bi se sudar ostvario i kako bi nastala nova molekula. Minimalna energija koju molekula treba imati kako bi došlo do reakcije (sudara) je energija aktivacije koja je proporcionalna temperaturi. Što je temperatura veća (u slučaju proizvodnje biodizela i preko 200°C), veća je mogućnost većeg broja sudara.^{22,25} Kao što je navedeno, glavni nedostatak nekatalitičke transesterifikacije je energetska trošak potreban za postizanje visokih temperatura na kojima se ova vrsta reakcija provodi. Kako bi se ti troškovi minimizirali, a reakcija ubrzala, reakcije transesterifikacije se provode uz prisustvo katalizatora koji smanjuje energije aktivacije i ubrzava provedbu reakcije pri znatno nižim temperaturama.¹⁴

Katalitička transesterifikacija se dijeli na heterogenu i homogenu, ovisno o broju faza u kojima su reaktanti, produkti i katalizator. Homogena katalitička transesterifikacija odvija se pri uvjetima kada su sve komponente u istoj fazi, dok je kod heterogene transesterifikacije katalizator u pravilu različitog agregatnog stanja od ostalih komponenata.²²

Industrijski procesi transesterifikacije najčešće se odvijaju uz prisutnost homogenog katalizatora koji može biti kiselina ili baza.²¹ Prednosti korištenja homogenih katalizatora su njihovo dobra dispergiranoost u istoj fazi s reaktantima pa je za provedbu reakcije potrebna manja količina katalizatora, reakcija se brže odvija te nisu potrebni ekstremni uvjeti za provedbu procesa (pH, temperatura, tlak) kako bi se postigla zadovoljavajuća konverzija. Katalizator se u reakciji ne troši, ne mijenja njenu konstantu ravnoteže te iz reakcije izlazi nepromijenjen. Kako bi se zaustavila daljnja reakcija, katalizator je u pravilu potrebno neutralizirati i izdvojiti ga iz reakcijske smjese.²²

Separacija katalizatora od ostalih komponenata reakcijske smjese može se pojednostaviti primjenom heterogenih katalizatora. Čvrsti, heterogeni katalizator ima mogućnost recikliranja te ga je moguće ponovno koristiti i tako smanjiti proizvodne troškove.²² Međutim, pri upotrebi čvrstih katalizatora nastaje višefazni sustav što rezultira smanjenjem brzine reakcije zbog povećanja otpora prijenosu tvari i topline koji tada postaju mjerodavni za ukupnu brzinu reakcije.

2.2.2.1. Lužnato katalizirana transesterifikacija

Za provedbu reakcije transesterifikacije se u današnje vrijeme najviše koriste homogeni lužnati katalizatori. Najčešće korišteni tipovi katalizatora su natrijev i kalijev hidroksid te natrijev i kalijev metoksid.¹⁹

Prednosti lužnato katalizirane reakcije nad kiselo kataliziranom reakcijom transesterifikacije su mnoge, a neke od njih su kratko reakcijsko vrijeme tj. brža reakcija, visoka konverzija u relativno blagim uvjetima, a reakcijske smjese su manje korozivne pa nisu potrebni skupi nekorozivni materijali za opremu. Za provedbu lužnato kataliziranih reakcija transesterifikacije potreban je manji reakcijski volumen zbog povoljnijeg omjera reaktanata u ovom procesu (nije potrebno dodavati određeni reaktant u suvišku). Nedostatak procesa lužnato katalizirane reakcije transesterifikacije je što prisustvo vode u reakcijskoj smjesi dovodi do saponifikacije, odnosno do reakcije transesterifikacije u kojoj kao sporedni produkt nastaje sapun. Navedeno smanjuje konverziju i iskorištenje te otežava separaciju glicerola.¹⁵

2.2.2.2. Kiselo katalizirana transesterifikacija

Najčešće korišteni katalizatori za kiselo kataliziranu transesterifikaciju su sumporna ili sulfonska kiselina. Produkti koji nastaju u ovoj reakciji su alkilni esteri i glicerol.¹⁹

Prednosti korištenja kiselih katalizatora su veliki prinos alkilnih estera te mogućnost istovremene provedbe reakcija esterifikacije i transesterifikacije jer zbog prirode katalizatora ne može doći do reakcije saponifikacije.¹⁵

Brzina reakcije, koja je do 4000 puta sporija od bazično kataliziranih reakcija transesterifikacije je glavni nedostatak primjene ovih katalizatora. Također, reakcije kiselo katalizirane transesterifikacije zahtijevaju više temperature, u pravilu iznad 100°C što posljedično dovodi do većeg energetskeg troška.²⁴

2.2.2.3. Enzimatsko katalizirana transesterifikacija

Korištenjem enzima kao biološkog katalizatora u reakcijama transesterifikacije izbjegava se nastanak većine neželjenih nusprodukata, osim glicerola.^{23,25} S druge strane, glicerol koji nastaje u ovoj vrsti reakcija je zadovoljavajuće čistoće pa se nakon izdvajanja iz reakcijske smjese može koristiti i u druge svrhe. Primarni produkt, biodizel, koji se dobiva enzimatsko kataliziranom transesterifikacijom je visoke čistoće, a enzim je nakon reakcije pogodan za ponovnu upotrebu.²¹

Enzim koji se najčešće koristi za dobivanje biodizela u reakciji transesterifikacije je enzim lipaza. Prednosti enzimatsko katalizirane transesterifikacije nad ostalim vrstama transesterifikacija su ušteda na sirovinama zbog malog omjera alkohola i ulja u reakciji te na energiji jer se cijeli proces odvija u blagim uvjetima. Uz ovo enzimi kao katalizatori su ekološki prihvatljiviji.²³

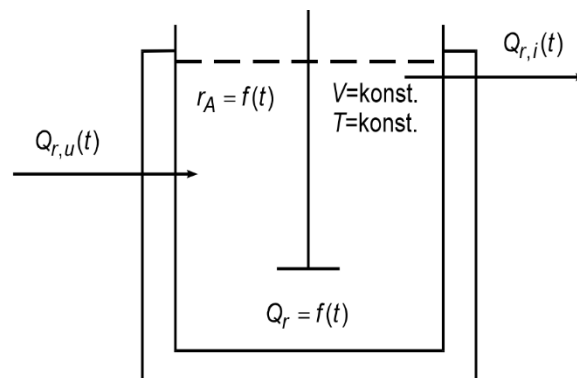
Relativno niska konverzija i dugo vrijeme provedbe reakcije vrijeme glavni su nedostaci enzimatskih katalizatora u odnosu na lužnati katalizator u reakcijama transesterifikacije. Osim visoke cijene enzima dodatni problem je prisutnost polarnih molekula poput metanola ili etanola koji smanjuju stabilnost i aktivnost enzima lipaza.²³

Enzimi kataliziraju različite vrste reakcija, ali svaki pojedinačni enzim u pravilu katalizira specifičnu reakciju.²⁵ Kao što je već navedeno enzim koji je korišten u ovom radu je enzim lipaza. Lipaze pripadaju skupini enzima koji kataliziraju hidrolizu lipida. Lipaze ubrzavaju hidrolizu estera, a karakteristične su po tome da se ne koriste samo kao katalizator u procesu hidrolize, već i u reakcijama kao što su alkoholiza, aminoliza, hidroliza i sl. Enzimi lipaze dobivene iz kvasaca i plijesni se najviše koriste u sintezi biodizela zbog pristupačnih cijena i visokih iskorištenja na biodizelu. Značajna karakteristika enzima lipaza je njena selektivnost, a pravilnim izborom enzima lipaza odvijanje reakcije se može usmjeriti k dobivanje čistog proizvoda uz velike prinose.²⁶

2.3. Vrste reaktora u proizvodnji biodizela

2.3.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti ili šaržni reaktor (engl. *batch reactor*), prikazan na Slici 2., najčešće je korištena vrsta reaktora u proizvodnji biodizela. To je zatvoreni sustav s obzirom na tok tvari što znači da nema izmjene reakcijske smjese s okolinom. Izmjena topline s okolinom je moguća ako stijenke nisu izolirane. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje pomoću magneta i magnetske miješalice ili pomoću miješala. Izgledom sliči kotlu, a najčešće je još opremljen plaštom za grijanje i hlađenje reakcijske smjese. Uz pretpostavku idealnog miješanja vrijednosti svih procesnih parametara u svakoj točki volumena reaktora su iste. Kotlasti reaktor se često koristi u industriji, uglavnom za provedbu reakcija u kapljevitoj fazi te za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama.²⁰



Slika 2. Shema idealnog kotlastog reaktora

2.3.2. Cijevni reaktor

Cijevni reaktor je osnovni tip reaktora koji se koristi u kontinuiranoj proizvodnji u kemijskoj industriji. U većini cijevnih reaktora provode se heterogeni katalitički procesi s katalizatorima vezanim za kruti nosač pri čemu su reaktanti u kontinuiranoj kapljevitoj ili plinovitoj fazi koja protječe kroz reaktor i struji oko nosača katalizatora. Kontinuiranom proizvodnjom postižu se veliki proizvodni kapaciteti kao što je to na primjer u petrokemijskoj industriji, rafinerijama, proizvodnji mineralnih gnojiva, itd. Većina procesa je egzotermna tako da su u pravilu cijevni katalitički reaktori opremljeni s izmjenjivačem topline izvedeni u obliku plašta cijev u cijev.²⁰ Primjena biokemijskih cijevnih reaktora je uvjetovana razvojem tehnologije kontinuirane sterilizacije. Posebnu primjenu cijevni biokemijski reaktori imaju u procesima biotehnološke obrade otpadnih voda.

2.3.2.1. Mikroreaktori

Jedan od podtipova cijevnih reaktora su mikroreaktori, reaktorski sustavi izvedeni u mikroskopskom mjerilu, a sastoje se od mikrokanala promjera 10 – 500 µm urezanih u čvrstu pločicu poput stakla, polimera ili nekog drugoga materijala.²¹

Zbog takvih dimenzija mikroreaktori imaju brojne prednosti nad makrosustavima. Neke od tih prednosti su intenzivniji prijenos tvari i topline, laminaran tok fluida te jednostavan prijenos u veće mjerilo. Laminarni tok unutar mikrokanala pojednostavljuje modeliranje i kontrolu procesa. Mali promjeri mikrokanala rezultiraju velikim omjerom površine i volumena mikroreaktora, čime se povećava intenzitet procesa. Proces koji se zbivaju unutar mikroreaktora se smatraju sigurnijima i ekonomičnijima jer se koriste manje količine reaktanata i katalizatora, a samim time nastaju i manja količina otpada.²¹

2.4. Analitičke metode ispitivanja biodizela

Kako bi se uspješno pratila proizvodnja biodizela, a u konačnici analizirao i gotov proizvod, razvijene su različite analitičke metode. Jedan od prvih pokazatelja uspješnosti provedbe procesa proizvodnje biodizela je nastanak estera masnih kiselina te glicerola. Najčešće korištene metode za praćenja njihove koncentracije su UV-VIS spektrofotometrijska metoda za praćenje glicerola²⁷, analiza uzoraka na plinskom kromatografu (glicerol i FAME)²⁸, a u posljednje vrijeme se sve više koristi NIR spektroskopija (FAME i glicerol).^{29,30}

2.4.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja, a služi za mjerenje apsorbancije ispitivanog uzorka kao funkcije valne duljine svjetlosti.²⁹ Spektrofotometrijska mjerenja se provode u uređajima koji koriste svjetlost točno određene valne duljine koja se dobije pomoću optičkih filtera (fotometri). Fotometrija je fizikalno-kemijska metoda koja se temelji na mjerenju apsorpcije svjetla koje prolazi kroz određenu tvar (otopinu).³¹ Apsorpcija je u izravnoj ovisnosti o koncentraciji otopljene tvari u otopini.

Izraz apsorpcija se odnosi na fizikalni proces apsorpcije svjetlosti, dok se apsorbancija odnosi na matematičku vrijednost.³¹

Spektrofotometar se baždari pomoću slijepe probe, koja također sadrži sve sastojke osim komponente čiju koncentraciju mjerimo. Pomoću nje se spektrofotometar podešava na nulu. Prije samog mjerenja potrebno je napraviti baždarnu krivulju s poznatim koncentracijama ispitivane tvari. Ona se dobiva tako da se koncentracije nanesu na apscisu, a vrijednosti apsorbancije na ordinatu.³¹

2.4.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*) je uobičajeni tip kromatografije korišten u analitičkoj kemiji za odvajanje i analizu spojeva koji mogu isparavati bez razgradnje.

Način rada plinske kromatografije je takav da se prethodno pripremljeni uzorak prvo injektira u plinski kromatograf. Nakon toga se uzorak plinskim tokom prenosi do cijevi za separaciju, tzv. kolona. Kao plin nosioc mogu se koristiti inertni plinovi kao što su helij ili dušik. Komponente od kojih se sastoji uzorak separiraju se unutar kolone. Detektor na izlazu iz kolone mjeri količinu analita koji iz nje izlazi. Za određivanje koncentracije analita u uzorku, potrebno je prethodno analizirati standardne uzorke analita poznatih koncentracija. Kako bi izračunali koncentraciju nepoznatog uzorka potrebno je usporediti površinu ispod pika i retencijsko vrijeme standardnog uzorka poznate koncentracije s uzorkom nepoznate koncentracije.

2.4.3. NIR spektroskopija

Analitička metoda NIR (engl. *Near Infra Red*) spektroskopije temelji se na apsorbanciji elektromagnetskog zračenja valne duljine u rasponu 780-2500 nm. Prije mjerenja NIR

spektrometrom, potrebno ga je kalibrirati prema referentnim metodama za tvar za koju se ispituje. Kalibracija se obično provodi primjenom kemometrije.⁶

NIR spektroskopija našla je svoju primjenu u analizi sastava te funkcionalnoj i senzorskoj analizi sastojaka hrane, procesnih međuprodukata i gotovih proizvoda u stvarnom vremenu. Prednosti analize NIR spektrometrom je što često nije potrebna priprema uzorka, a omogućuje istovremeno mjerenje nekoliko sastavnih tvari. Analiza je jednostavna i brza te se može provoditi *off-line* i *on-line*.³²

Prilikom ozračivanja uzorka, svjetlost se apsorbira selektivno u skladu sa specifičnim frekvencijama vibracija prisutnih molekula i time dolazi do nastajanja spektra.⁶ Apsorpcijski spektar u NIR području nastaje preklapanjem osnovnih apsorpcijskih vrpca, iz tog razloga je mjerni signal nepravilna krivulja, bez pojedinih oštro izrađenih apsorpcija.

Ovisno o uzorku i njegovom agregatnom stanju (krutina ili kapljevina), kao i o samoj izvedbi procesa (kontinuirani ili šaržni), uzorak se snima u kivetu ili pomoću sonde. Kad se snima krutina uzorak se stavi na pločicu direktno ispod sonde, dok se kapljevina ulije u kivetu i postavi na točno određeno mjesto unutar instrumenta. U oba slučaja važno je paziti da nema utjecaja vanjskog svjetla koje utječe na mjerni rezultat.⁶

2.4.4. Kemometrija

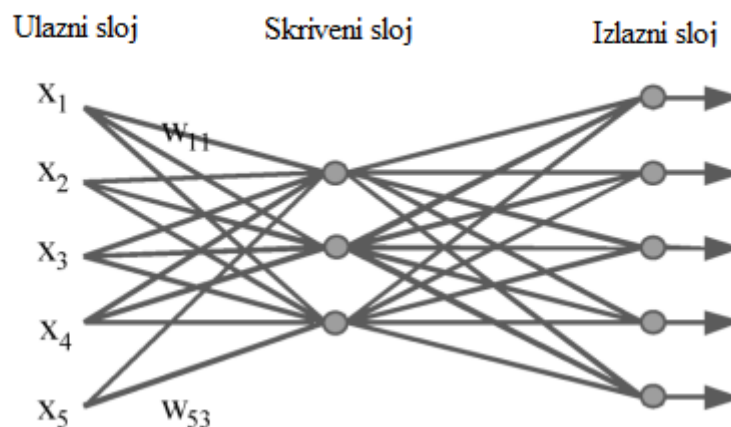
NIR spektroskopija uzoraka često daje rezultate u kojima se spektri često preklapaju i može ih biti stotine, a s tako velikim brojem nemoguće je jasno odrediti rezultate. Stoga se pristupa korištenju kemometrije, znanstvene discipline koja koristi matematičke i/ili statističke metode kako bi oblikovala i odabrala optimalan mjeriteljski postupak ili eksperiment te omogućila dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka. Kemometrija omogućuje povezivanje rezultata mjerenja na kemijskim sustavima u organizirani sustav.^{33,34} U istraživanju koje pokriva ovaj rad korištene su sljedeće metode:

- Analiza glavnih komponenta, PCA (eng. *Principal Component Analysis*)
- Umjetne neuronske mreže, ANN (eng. *Artificial Neural Networks*).

PCA se koristi za obradu velikog broja podataka dobivenih NIR metodom. PCA uočava razlike u snimljenim spektrima uzoraka, te ih obrađuje tako da se dobiju najvažnije karakteristike iz kojih se dobivaju nove ortogonalne varijable. Glavna zadaća PCA analize je nakon dobivenih spektara uzoraka smanjiti broj ukupnih varijabli s kojima se radi, a da se pri tome što je više moguće sačuva varijanca. Rezultati PCA analize obično se prikazuju pomoću

omjera dobivenih faktora gdje prvi faktor uvijek objašnjava najveći dio varijance, a ostali faktori manji dio varijance i to grafičkim prikazom prva dva faktora koji onda prikazuju grupiranje podataka prema njihovim sličnostima.³⁵

Uz PCA analizu, ispitana je mogućnost korištenja umjetnih neuronskih mreža za predviđanje vrijednosti koncentracije promatranih analita. Osnovni princip funkcioniranja ANN je razvijanje matematičkih algoritama koji neuronskoj mreži daju sposobnost učenja oponašajući procesiranje podataka i prikupljanje znanja ljudskog mozga.³⁶ S obzirom na složenost ljudskog mozga, neuroni su poredani u formi slojeva koji čine tzv. „mrežnu arhitekturu“. Jedan od najkorištenijih modela je troslojna unaprijedna mreža prikazana na slici 3. Ovakva mreža sastoji se od tri sloja: ulazni sloj prima ulazni signal iz skupa podataka i prosljeđuje informaciju do sljedećeg sloja neurona. Slojeve između ulaznog i izlaznog nazivamo skrivenim slojevima. Treći, izlazni sloj procesira ulaznu informaciju iz prethodnog sloja i prikazuje ju kao izlaznu informaciju.³⁷



Slika 3. Primjer neuronske mreže (x_{1-5} – ulazne varijable, w_{1-53} – međuvarijable)³⁷

Prilikom izbora najboljih neuronskih mreža vodilo se računa da imaju najveće preciznosti (R^2) za učenje, testiranje i validaciju uz što manju pogrešku (RMSE – eng. *Root-Mean Square Error*).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom istraživanju ispitana je mogućnost primjene NIR spektroskopije za praćenje koncentracije glicerola u procesu sinteze biodizela. Kako bi se usporedile različite analitičke metode za mjerenje koncentracije glicerola (plinski kromatograf, UV-VIS spektrofotometar, NIR spektrometar), proveden je proces sinteze biodizela transesterifikacijom jestivog suncokretovog ulja u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru kataliziran enzimom lipaza.

3.1. Materijali

3.1.1 Kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- acetilaceton, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- amonijev acetat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- glicerol, (redestiliran), Kemika, Hrvatska
- jestivo suncokretovo ulje, Zvijezda, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat, Lach-ner d.o.o., Češka
- kalijev hidrogenfosfat, Merck, Njemačka
- klorovodična kiselina, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L), Sigma-Aldrich, Njemačka (komercijalni enzim)
- metanol, Lach-ner d.o.o., Češka
- natrijev meta periodat, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- n*-heksan, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- n*-heptan, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- octena kiselina, Qingdao Kaimeiter International Trade Co., Kina

3.1.2. Oprema

U eksperimentima je korištena sljedeća oprema:

- centrifuga Universal 320 R, Hettich, SAD
- magnetska miješalica Combimag Reo, Ika, Kina
- plinski kromatograf s FID detektorom, GC-2014, Shimadzu, Japan
- spektrofotometar UV-1601, Shimadzu, Japan

- tresilica Vibromix 313 EVT, Tehnica, Slovenija
- vodena kupelj Thermomix 1460, Braun, Njemačka
- NIR spektrometar Control Development, Inc., NIR-128-1.7-USB/6.25/50 μ m, Sjedinjene Američke Države

3.2. Metode

3.2.1. Proizvodnja biodizela u kotlastom reaktoru

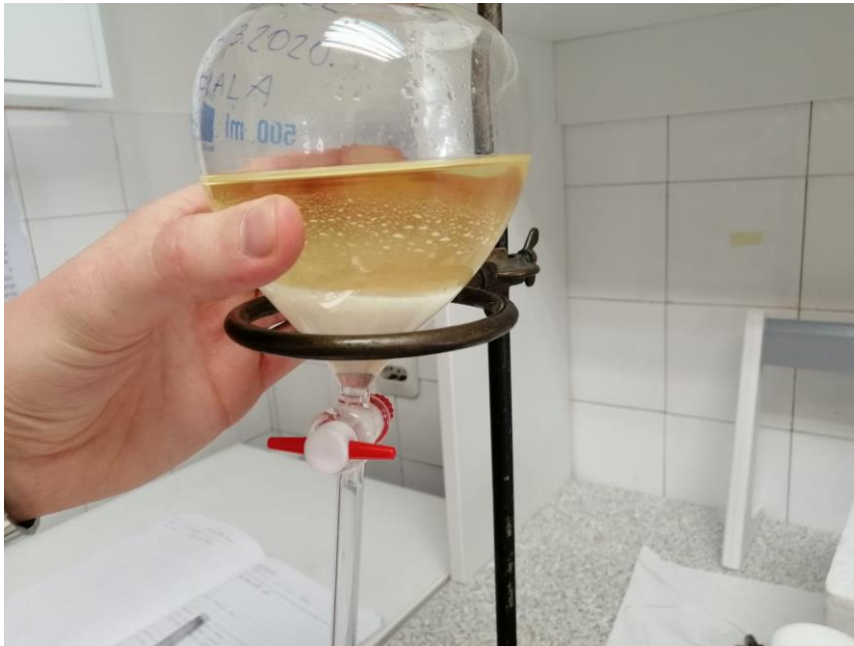
U kotlasti reaktor je dodano 225 g suncokretovog ulja i 27,97 g metanola. Metanol se dodaje u suvišku kako bi reakcija transesterifikacije bila dominantna, tj. kako bi se ravnoteža reakcije transesterifikacije pomaknula u desno. Reaktorska posuda je postavljena na magnetsku miješalicu (600 okr/min) kako bi se osiguralo dobro miješanje svih komponenti reakcijske smjese. Temperatura reakcijske smjese je održavana na 40°C putem vanjskog termostata i dvostruke stjenke kojom je reaktor bio opremljen. Reakcija je pokrenuta na način da je u prethodno opisanu smjesu dodano 22,5g suspenzije komercijalnog enzima *Lipolase* 100L (početna koncentracija u reakcijskoj smjesi, $\gamma_0 = 0.3$ mg/mL).

Kroz jedan od otvora na vrhu reaktora uvedena je injekcija koja je korištena za uzimanje uzoraka (Slika 4.). U definiranim vremenskim intervalima iz reakcijske smjese je uzimano 2 mL uzorka koji su potom analizirani. U procesu u kojem je koncentracija glicerola praćena kontinuirano, sonda NIR spektrometra bila je uronjena direktno u reakcijsku smjesu.



Slika 4. Uzimanje uzorka iz šaržnog reaktora

Nakon 50 sati provođenja sinteze biodizela reakcijska smjesa je prebaćena u lijevak za odjeljivanje (Slika 5.) te je djelomično pročišćeni biodizel korišten za druga istraživanja.



Slika 5. Reakcijska smjesa u lijevku za odjeljivanje

3.2.3. Proizvodnja biodizela u mikroreaktoru

Sinteza biodizela povedena je u teflonskom mikroreaktoru širine 500 μm i duljine 1,2 m, ukupnog volumena 236 μL . Teflonski mikroreaktor bio je opremljen s 3 ulaza Ψ - oblika.

Tri klipne pumpe bile su spojene na mikroreaktor teflonskim cijevima pri čemu je pomoću prve klipne pumpe u reaktor dobavljano ulje, pomoću druge metanol, a pomoću treće suspenzija enzima. Mikroreaktor je bio postavljen u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C kako bi se proces sinteze proveo pri optimalnoj temperaturi. Kod *on-line* mjerenja izlaz iz reaktora bio je spojen na protočnu kivetu povezanu na NIR sondu. Kod provedbe *off-line* mjerenja uzorci na izlazu iz protočne kivete sakupljani su na ledu te korišteni u kasnijim analizama na plinskom kromatografu i UV-VIS spektrofotometru.

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije glicerola

3.2.3.1. Priprema otopina

Prije pripreme uzoraka bilo je potrebno pripremiti radne otopine. Prva pripremljena radna otopina je vodena otopina octene kiseline koncentracije 1,6 mol/L koja je pripremljena na način da je 9,6 g octene kiseline izvagano u tikvici od 100 mL nakon čega je ona nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Druga radna otopina je vodena otopina amonijeva acetata koncentracije 4 mol/L koja je pripremljena na način da je 30,8 g amonijeva acetata odvagano u tikvicu od 100 mL koja je potom napunjena destiliranom vodom do oznake. Ove otopine

stabilne su kroz duže vremensko razdoblje i čuvane su na temperaturi 25°C. Miješanjem jednakih volumena ovih dvaju otopina pripremljen je pufer pH 5,5. Nakon toga su pripremljene otopine acetilacetona koncentracije 0,2 mol/L na način da se 195 mg acetilacetona otopilo u 20 mL prethodno pripremljene otopine octene i 20 mL otopine amonijevog acetata te otopina natrijevog perjodata koncentracije 10 mol/L koja je pripremljena otapanjem 84 mg natrijevog meta perjodata u 20 mL otopine octene kiseline i 20 mL otopine amonijevog acetata. Na ovaj način dobivene potrebno je pripremati svakodnevno.²⁷

Radno otapalo je pripremljeno na način da su pomiješani jednaki volumeni destilirane vode i 95%-tnog etanola. To se otapalo koristi za ekstrakciju uzorka, reakciju i pripremu radnih otopina glicerola.

3.2.3.2. Priprema radnih otopina glicerola

Za pripremu radnih vodenih otopina glicerola izvagano je 150 mg glicerola u tikvici volumena 50 mL te je tikvica dopunjena radnim otapalom do oznake. Na taj način dobivena je otopina glicerola masene koncentracije 3 mg/mL. Preciznom pipetom se iz ovako pripremljene otopine glicerola uzima 0,5 mL i prenosi u kalibriranu tikvicu od 100 mL koja se potom nadopuni radnim otapalom do oznake. Na ovaj način je pripremljena otopina glicerola koncentracije 0,036 mg/mL. Tako pripremljene otopine stabilne su nekoliko tjedana na temperaturi 25 °C.

3.2.3.3. Izrada baždarnog pravca

Kako bi izradili baždarni pravac potrebno je pripremiti 10 epruveta od 10 mL u koje se redom otpipetira 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 i 2,00 mL 0,036 mg/mL otopine glicerola. Svaku epruvetu se dopuni radnim otapalom na način da je ukupni volumen 2 mL. Nakon toga se u svaku epruvetu doda 1,2 mL otopine natrijevog perjodata i promiješana homogenizatoru 30 s. Potom se u svaku epruvetu doda 1,2 mL 0,2 mol/L otopine acetilacetona te stavi u vodenu kupelj termostatiranu na 70 °C, 1 min, uz ručno miješanje. Tako dobiveni uzorak se hladi 2 min uranjanjem epruvete u času s vodom na sobnoj temperaturi.

Ovako pripremljeni uzorci se prenose u plastične kivete spektrofotometra (Slika 6.). Mjerenje se provodi na valnoj duljini $\lambda=410$ nm pri čemu se prvo mjeri apsorbanacija praznih kiveta, a zatim kiveta s uzorcima. Mjerenje svakog uzorka se ponavlja tri puta. Iz parova podataka koncentracija glicerola u odnosu na izmjerenu apsorbanaciju izrađuje se baždarni dijagram (Prilog 1).



Slika 6. Spektrofotometar

3.2.3.4. Analiza uzoraka nepoznate koncentracije glicerola

U epruvetu od 10 mL potrebno je odvagati 0,5 g uzorka biodizela, otopiti uzorak u 2 mL heksana te dodati 2 mL ekstrakcijskog otapala, etanola. Epruveta se potom miješa 5 min, nakon čega se centrifugira 15 min pri 2000 okr/min. Nakon centrifugiranja se 0,5 mL donjeg sloja prenese u novu epruvetu od 10 mL te se u uzorak doda 1,5 mL radnog otapala i 1,2 mL 10 mmol/L otopine natrijevog perjodata. Nakon toga se u uzorak dodaje 1,2 mL 0,2 mol/L otopine acetilacetona uz ručno miješanje i grijanje u vodenoj kupelji termostatiranoj na 70 °C kroz 1 min. Tako dobiveni uzorak se hladi 2 min uranjanjem epruvete u času s vodom na sobnoj temperaturi. Ovako dobiveni uzorak se ponovno centrifugira 1 min na 2000 okr/min. Dobiveni supernatant se analizira na spektrofotometru pri valnoj duljini $\lambda=410$ nm, a prije mjerenja je potrebno izmjeriti asorbanciju praznih kiveta. Svako mjerenje je provedeno tri puta, a koncentracija glicerola je izračunata iz izmjerene apsorbancije i baždarnog pravca (Prilog 1.).

3.2.4. Određivanje koncentracije glicerola i biodizela plinskom kromatografijom

Koncentracija uzoraka FAME i glicerola koju su prikupljeni u različitim vremenskim periodima sinteze biodizela određuje se na plinskom kromatografu. U radu su korišteni plinski kromatograf Shimadzu GC-2014 s FID detektorom i kapilarna kolona Zebron ZB Wax ($L = 30$ m, I.D. = 0,53 mm, $d = 1,00$ μ m). Kao plin nosioc korišten je dušik.

Uzorak reakcijske smjese je prije analize potrebno razrijediti 100 puta s *n*-heptanom i profiltrirati filtrom Chromafil Extra RC-45/25 promjera pora 0,45 μ m. Kada se određuje koncentracija glicerola uzorak se razrjeđuje s etanolom kao otapalom.

Nepoznate koncentracije biodizela i glicerola izračunate su iz kromatograma pomoću prethodno napravljenih baždarnih dijagrama (Prilog 2. – 7.). Za izradu baždarnih dijagrama korišten je standard metilnih estera masnih kiselina F.A.M.E. mix GLC - 10 kojega čine metilni

esteri pet masnih kiselina: palmitinske, stearinske, oleinske, linolne, linoleinske. Standard F.A.M.E. mix GLC- 10 otopljen je u 5 mL *n*-heptana (99%) pri čemu je koncentracija svakog pojedinog metilnog estera u otopini 4 mg/mL. Ovako dobivena otopina je razrijeđena na način da su pripremljene otopine u kojima je koncentracija komponenata F.A.M.E. mix GLC - 10 bila 0,0,25, 0,5, 1 i 2 mg/mL. Ovako dobiveni razrijeđeni standardi su analizirani na plinskom kromatografu te su temeljem rezultata mjerenja izrađeni baždarni pravci za estere masnih kiselina (Prilozi 3. – 7.). Na isti način napravljen je i baždarni dijagram za glicerol, s tim da je pripremljeno osam uzoraka u kojima je koncentracija glicerola bila 0, 0,3, 0,6, 0,75, 1,0, 1,5, 2,5 i 3,0 mg/mL (Prilog 2.).

Nepoznate koncentracije glicerola i biodizela u uzorcima prikupljenim tijekom procesa transesterifikacije izračunate su pomoću baždarnih pravaca i odgovarajućih kromatograma. Analiza svakog uzorka je provedena tri puta.

3.2.5. Određivanje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom

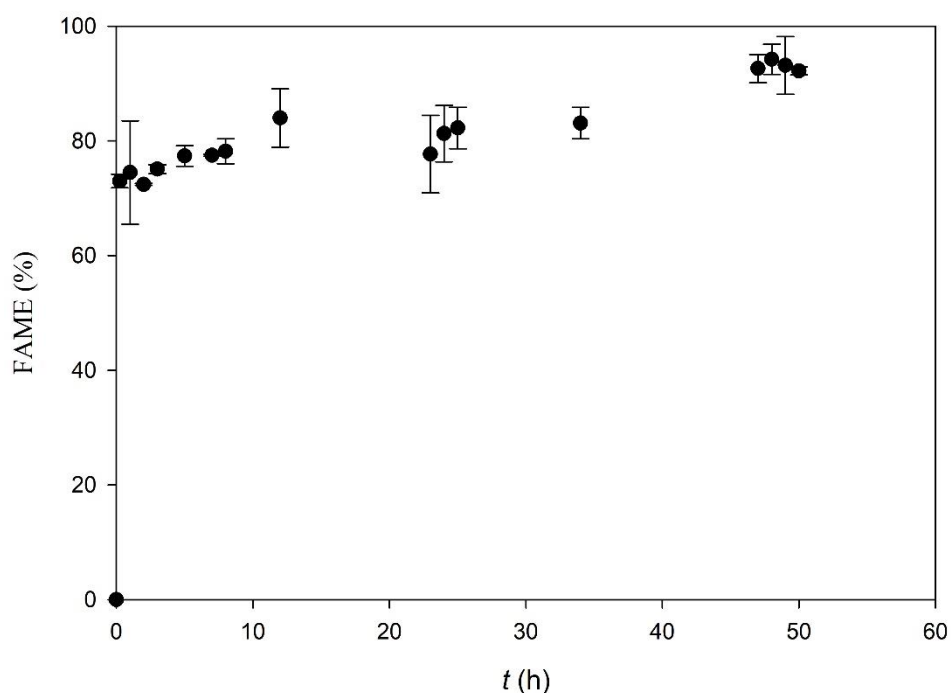
Koncentracija glicerola na NIR spektrometru određena je na način da je uređaj prvo kalibriran na analiziranu komponentu. Nakon toga su pripremljene otopine glicerola u otopini vode i etanola (volumni omjer 50:50). Ove koncentracije su redom bile: 0, 1, 5, 10, 15, 25, 40, 50, 60, 75 i 100 mg/mL. Pripremljene otopine prenesene su u kivete te su iste postavljene u uređaj kako bi se snimio spektar glicerola u rasponu valnih duljina od 741 do 1700 nm. U slučaju kada je koncentracija glicerola mjerena kontinuirano u kotlastom reaktoru, NIR sonda je bila direktno uronjena u reakcijsku smjesu kako bi se omogućilo kontinuirano snimanje spektara. Prilikom mjerenja koncentracije glicerola u mikoreaktoru, izlaz iz mikoreaktora bio je spojen na protočnu kivetu spojenu na NIR sondu spektrometra. Promjene spektra zabilježene su na računalu te naknadno analizirane.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu ispitane su različite analitičke metode za praćenje koncentracije glicerola u procesu enzimatske transesterifikacije jestivog ulja kojim nastaju biodizel i glicerol kao nusprodukt. Uz korištene standardne analitičke metode, kao što su plinska kromatografija i UV-VIS spektrofotometrija, korištena je i NIR spektroskopija. U radu je ispitana mogućnost korištenja NIR spektroskopije *off-line* i *on-line* načinu rada za analizu koncentracije glicerola.

4.1. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru

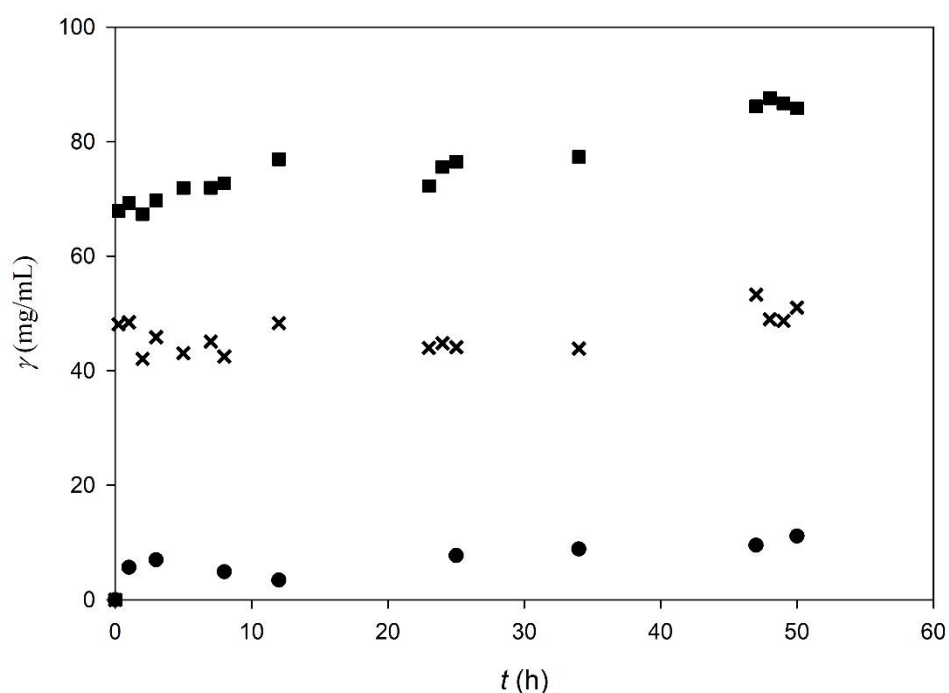
Biodizel je sintetiziran u kotlastom reaktoru te je praćena dinamička promjena iskorištenja na biodizelu (% FAME). Kao što je prikazano na Slici 7., sinteza biodizela u kotlastom reaktoru je uspješno provedena pri čemu je iskorištenje od $I = 93\%$ ostvareno nakon 50h.



Slika 7. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru

Iz podataka prikazanih na Slici 7., a temeljem stehiometrije reakcije transesterifikacije izračunata je teorijska koncentracija glicerola koja nastaje u procesu. Kao što se iz rezultata prikazanih na Slici 8. vidi očekivana, teorijska koncentracija ukupnog glicerola tijekom provedbe procesa transesterifikacije bila je u rasponu od 70 – 93 mg/mL. Na Slici 8. prikazani su i rezultati mjerenja koncentracije glicerola dobiveni plinskom kromatografijom. Kao što je

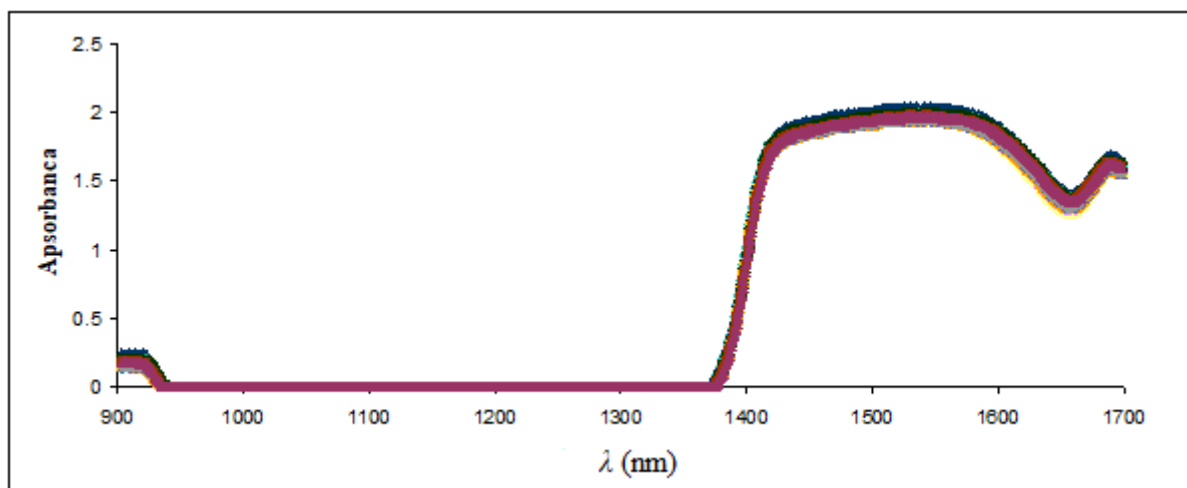
iz rezultata vidljivo, dobivene vrijednosti kreću se u području 45 – 65 mg/mL što je znatno manje od izračunate, teorijske vrijednosti. Razlog ovoj razlici je vjerojatno velika brzina taloženja glicerola koji se istaloži tijekom prikupljanja i pripreme uzorka za analizu te tijekom analize na plinskom kromatografu. Uz analizu plinskom kromatografijom provedena je i analiza glicerola na UV-VIS spektrofotometru, a rezultati su prikazani na Slici 8. Kao što je vidljivo iz rezultata, koncentracija glicerola izmjerena ovom metodom je značajno manja od teorijske, izračunate koncentracije, a odstupanja izraženija nego kod mjerenja koncentracije glicerola plinskom kromatografijom.



Slika 8. Usporedba analitičkih metoda za mjerenje koncentracije glicerola s izračunatim, teorijskim vrijednostima (■ – izračunati, teorijski glicerol, x – plinska kromatografija, ● – spektrofotometrija)

4.2. NIR spektroskopija

Kao alternativa prethodno spomenutim metodama provedeno je mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom. Prvi korak bilo je snimanje NIR spektara na temelju raspona koncentracija glicerola od 0 do 100 mg/mL. Dobiveni spektri prikazani su na Slici 9.



Slika 9. NIR spektar koncentracija glicerola u rasponu od 0 do 100 mg/mL

Iz spektra prikazanog na Slici 9. vidljivo je postojanje područja u kojemu nema nikakve razlike u spektrima (941-1370 nm) koje je kao takvo je neprimjenjivo za daljnju analizu glavnih komponenata PCA metodom. Kako je jedna od prednosti analize glavnih komponenata PCA metodom to što djeluje na principu traženja sličnosti i razlika između uzoraka u ovome dijelu spektra ona nije primjenjiva. S druge strane područje od 1370 – 1700 nm pokazuje razliku u spektru te je to područje obuhvaćeno PCA metodom. U sljedećem koraku bilo je potrebno odabrati neuronsku mrežu potrebnu za obradu dobivenih podataka. U Tablici 1. prikazano je 5 definiranih neuronskih mreža (10-13-1, 10-9-1, 10-6-1, 10-8-1, 10-7-1) i njihove značajke. Prvi broj u arhitekturi mreže označava broj faktora dobivenih PCA analizom, sljedeći broj je broj neurona, a posljednji broj izlaza. Na temelju preciznosti i pogreške učenja, preciznosti i pogreške testiranja te preciznosti i pogreške validacije odabrana je najbolja mreža. Iako sve predložene neuronske mreže koje su navedene u tablici imaju iznimno visoke vrijednosti tj. sve su vrijednosti preciznosti učenja, testiranja i validacije više od 0,9, neuronska mreža pod rednim brojem 3. (označena crveno) je izabrana zbog najmanjeg broja neurona u skrivenom sloju što osigurava dodatnu stabilnost mreže.⁶ Također, u slučaju učenja neuronska mreža pod brojem 2, te u slučaju testiranja neuronske mreže pod brojem 1 i 4 imaju više vrijednosti R^2 kod validacije, odabrana neuronska mreža pod brojem 3 ima najvišu vrijednost preciznosti. Uz to, ova mreža se, što je vrlo bitno, odlikuje najmanjom pogreškom.

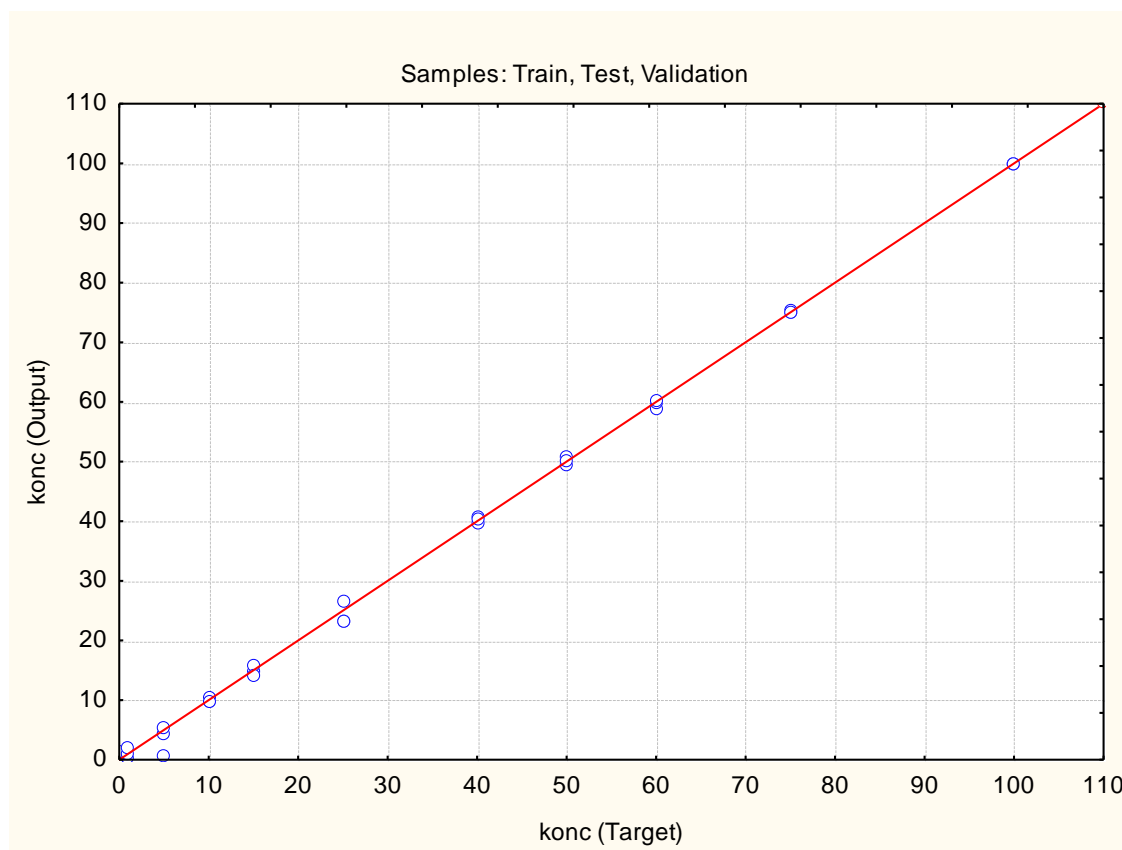
Kao što je spomenuto arhitektura 10-6-1 znači da je za ulazne varijable bilo 10 faktora dobivenih PCA analizom, 6 neurona je u skrivenom sloju a koncentracija glicerola je bila 1 izlaz. U ovom slučaju prvih 10 faktora PCA analize koji objašnjavaju 99,9 % varijabilnosti u podacima korišteni su kao ulazi za umjetne neuronske mreže. Za ovaj slučaj najbolje su se

pokazale umjetne neuronske mreže koje su koristile 60% ukupnih podataka za učenje, 20% za testiranje i 20% za validaciju te s 6-11 neurona u skrivenom sloju.

Tablica 1. Karakteristike umjetnih neuronskih mreža za predviđanje koncentracije glicerola

Redni broj	Arhitektura mreže	Preciznost učenja	Pogreška učenja	Preciznost testiranja	Pogreška testiranja	Preciznost validacije	Pogreška validacije
1.	10-13-1	0,9996	0,0000	0,9997	0,0001	0,9961	0,0006
2.	10-9-1	0,9999	0,0000	0,9989	0,0001	0,9912	0,0024
3.	10-6-1	0,9998	0,0000	0,9996	0,0000	0,9988	0,0002
4.	10-8-1	0,9997	0,0000	0,9997	0,0001	0,9980	0,0003
5.	10-7-1	0,9995	0,0001	0,9992	0,0001	0,9959	0,0007

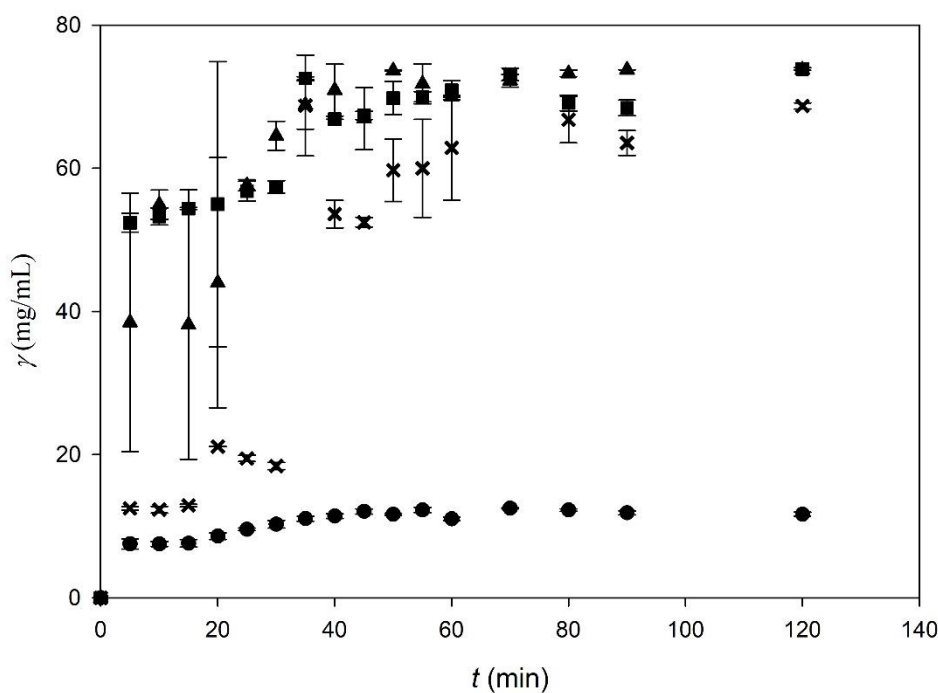
Na Slici 10. prikazana je korelacija predviđanja koncentracije glicerola izabrane neuronske mreže i eksperimentalnih vrijednosti dobivena u programskom paketu Statistica v.10.0 (StatSoft, SAD).



Slika 10. Usporedba koncentracija glicerola s predviđanjem odabrane neuronske mreže

4.3. Usporedba *off-line* NIR spektroskopije sa standardnim analitičkim metodama

Nakon što je pokazano dobro slaganje rezultata dobivenih nakon mjerenja NIR spektroskopijom i obrade podataka korištenjem neuronskih mreža s rezultatima mjerenja uzoraka poznatih koncentracija glicerola, NIR spektroskopija je primijenjena u analizi realnih uzoraka iz procesa proizvodnje biodizela. Ponovno je provedena sinteza biodizela u kotlastom rektoru te su u različitim vremenskim intervalima uzorci izuzimani iz reaktora i analizirani korištenjem plinske kromatografije, UV-VIS spektrofotometrije te NIR spektroskopije. Također, korištenjem plinskog kromatografa mjerena je koncentracija FAME na temelju koje je, kao i u prethodnom primjeru, izračunata teorijska količina glicerola koja nastaje tijekom procesa. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 12.



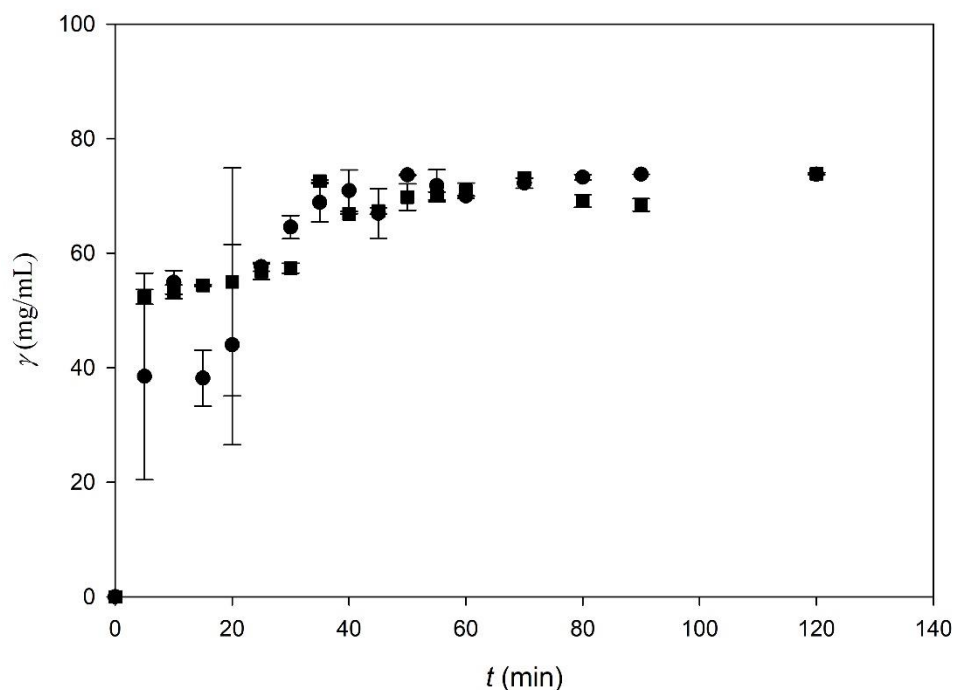
Slika 12. Usporedba analitičkih metoda za mjerenje koncentracije glicerola s izračunatim, teorijskim vrijednostima (■ – izračunati, teorijski glicerol, x – plinska kromatografija, ● – spektrofotometrija, ▲ – NIR spektroskopija)

Kao što je vidljivo iz podataka prikazanih na Slici 12., koncentracije glicerola mjerene UV-VIS spektrofotometrom pokazuju najveće odstupanje od teoretski izračunate koncentracije glicerola, dok su kod mjerenja glicerola plinskim kromatografom odstupanja nešto manja. Vjerojatni razlog za ova odstupanja je taloženja glicerola u uzroku tijekom njegove pripreme i analize. S druge strane, koncentracije glicerola dobivene pomoću NIR spektroskopije praktički

se podudaraju s izračunatim koncentracijama teoretskog glicerola čime je pokazna točnost metode.

4.4. *On-line* mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru

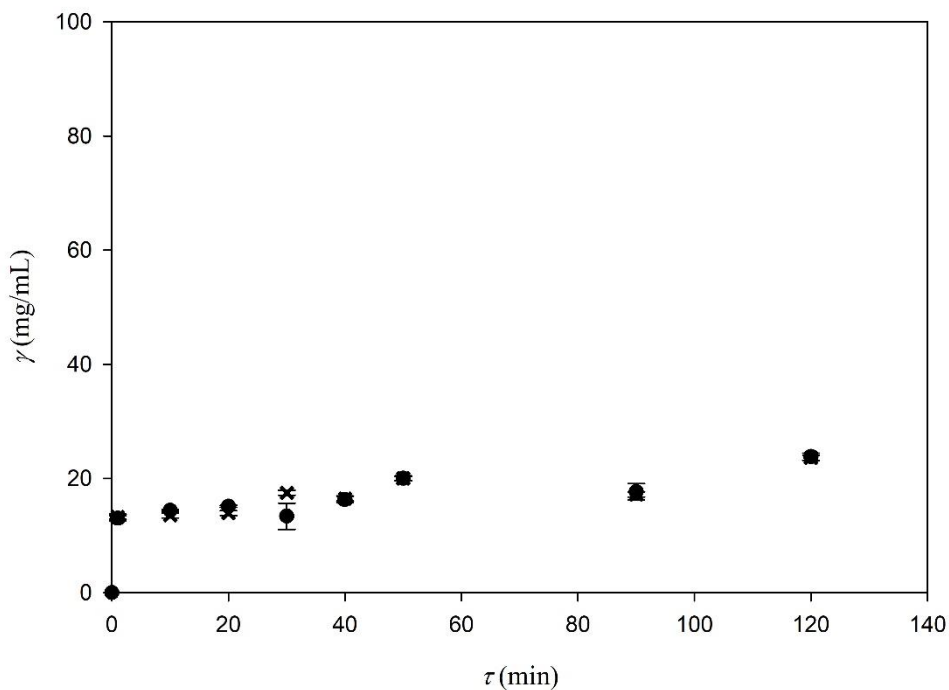
S obzirom na uspješno provedeno *off-line* mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom, provedene je *on-line* koncentracije glicerola u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru tijekom provedbe procesa transesterifikacije. Usporedba izračunate, teorijske vrijednosti koncentracije glicerola i koncentracija glicerola izmjerene NIR spektroskopijom prikazana je na Slici 13. za pokus proveden u šaržnom reaktoru.



Slika 13. *On-line* mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom tijekom reakcije transesterifikacije provedene u kotlastom reaktoru (■ – izračunati, teorijski glicerol, ● – NIR spektroskopija)

Kao i prilikom određivanja koncentracije glicerola *off-line* načinom mjerenja iz ovih rezultata vidljivo je dobro slaganje koncentracije izmjerene NIR spektroskopijom s izračunatim, teorijskim vrijednostima.

S obzirom na uspješno provedeno *on-line* mjerenje u kotlastom reaktoru, ispitana je i mogućnost *on-line* mjerenja koncentracije glicerola u kontinuiranom reakcijskom sustavu, odnosno u mikroreaktoru. Rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14. *On-line* mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom tijekom reakcije transesterifikacije provedene u mikroreaktoru (● – izračunati, teorijski glicerol, x – NIR spektroskopija)

Kao i u eksperimentu provedenom u kotlastom reaktoru, *on-line* mjerenje koncentracije glicerola NIR spektroskopijom pokazuje jako dobro slaganje s teorijskim, izračunatim vrijednostima koncentracije glicerola te pokazuje opravdanost ove metode mjerenja koncentracije glicerola u procesu transesterifikacije.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata provedenih eksperimenata može se zaključiti sljedeće:

- Sinteza biodizela u mikroreaktoru i kotlastom reaktoru je uspješno provedena. Nakon 50 sati provođenja reakcije iskorištenje biodizela u kotlastom reaktoru je bilo 93%, dok je iskorištenje u mikroreaktoru bilo 26%, za vrijeme zadržavanja $\tau = 2\text{h}$.
- Izračunata, teoretska koncentracija ukupnog glicerola za pokuse provedene u šaržnom reaktoru je bila u rasponu od 70 – 93 mg/mL. Koncentracija ukupnog glicerola mjerena plinskim kromatografom iznosila je 45 – 65 mg/mL, što je znatno odstupanje od teorijske vrijednost. Prilikom mjerenja koncentracije glicerola UV-VIS spektrofotometrom odstupanja su bila još i veća iz čega proizlazi da ni jedna od ovih metoda nije primjerena za mjerenje koncentracije ukupnog glicerola dobivenog u procesu transesterifikacije.
- Za obradu spektara dobivenih NIR spektroskopijom tijekom mjerenja koncentracije glicerola odabrana je arhitektura neuronske mreže 10-6-1 s najvećim R^2 i najmanjim brojem neurona u skrivenom sloju što osigurava dodatnu stabilnost mreže.
- U usporedbi s ostalim analitičkim metodama, pa čak i u slučaju *on-line* načina rada, NIR spektroskopija se pokazala najboljom metodom za mjerenje koncentracije glicerola u procesu transesterifikacije.

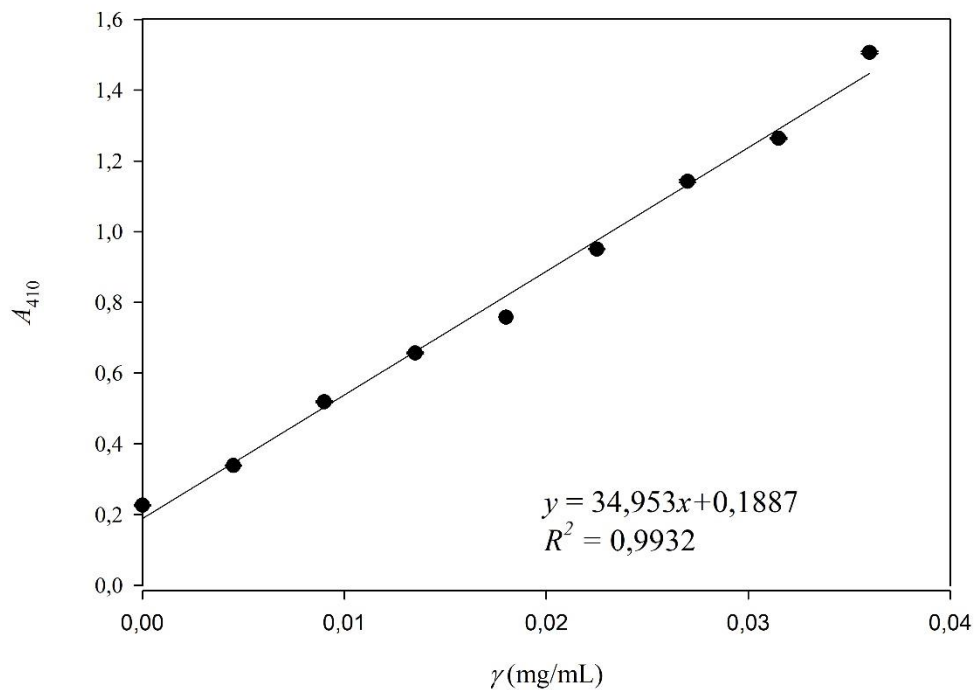
6. LITERATURA

- [1] Crvelin, B., Važnost fosilnih goriva za gospodarski razvoj Republike Hrvatske, Završni rad, Visoka poslovna škola Zagreb s pravom javnosti, 2016, str. 1-2
- [2] Sutlović, I., Izgaranje, nastavni materijali kolegija Energetika, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2018, str 1-3
- [3] Vlada RH, Zakon o energiji, Opće odredbe, Članak 3., NN 68/2001, Zagreb
- [4] Stojanović, M., Uporaba biodizela kao pogonskog goriva u cestovnom prometu, Pomorski fakulteta Sveučilišta u Rijeci, 2013, str. 134-136
- [5] Andričić, B., Kovačić, T., Čagalj, M., Transesterifikacija otpadnih jestivih ulja u svrhu proizvodnje biodizela, 2008, Split, str. 8-10
- [6] Gajdoš Kljusurić, J., Mjerne metode u znanosti o prehrani, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010, str. 1-6
- [7] Board, N., Modern technology of oils, fats and its derivatives, Asia pacific bussines press inc., Balaja off set Printers, Delhi, 2013, str. 1-10
- [8] Hernando, J., Leton, P., Matia, M.P., Novella, J.L., Alvarez-Builla, J.L., Biodiesel and FAME synthesis assisted by microwaves: Homogeneous batch and flow processes ,Fuel 86 (2006)1641-1644
- [9] Guinda, A., Dobarganes, M.C., Ruiz-Mendez, M. V., Mancha, M. Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. Eur. J. Lipid. Sci. Tech. 105 (2003) 130-137.
- [10] ASTM D6751-20, Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2020, www.astm.org
- [11] EN 14214:2008 Automotive fuels – Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – Requirement sand test methods, CEN – European Committee for Standardization, 2008
- [12] HRN EN 14214:2008 Goriva za motorna vozila – Metilni esteri masnih kiselina (FAME) za Dieselove motore, Hrvatski zavod za norme, 2008
- [13] Vlada RH, Uredba o kakvoći biogoriva, NN br. 141/2005, 145/2010 i 33/2011

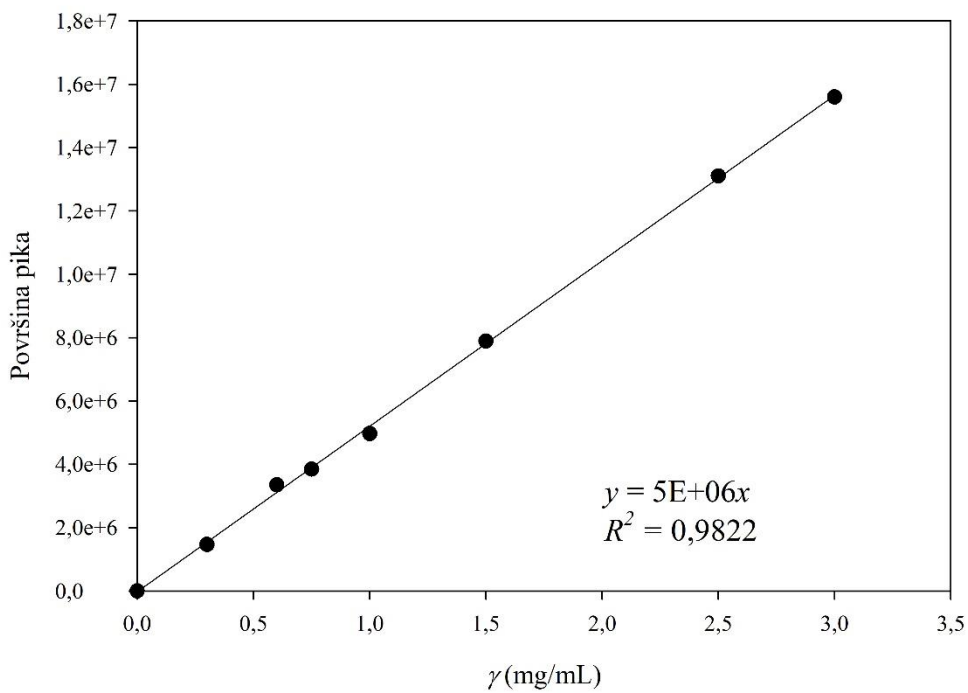
- [14] Sinčić, D., Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela I, Kem. Ind., 63 (2014) 19-31
- [15] Sinčić, D., Biodizel: svojstva i tehnologija proizvodnje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2008
- [16] Kondić, V., Višnjic, V., PISAČIĆ, K., Bojanić, B., Prednosti, nedostaci i ekološki učinci biodizelskog goriva, Teh. Glas., 9 (2015) 260-263
- [17] Ma, F., Hanna, M. A., Biodiesel production: A review, Bioresour. Technol. 70(1999) 1-15
- [18] Hranjec, M., Karboksilne kiseline i derivati, nastavni materijal iz kolegija Organska kemija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2020, str. 31
- [19] Franjo, M., Šalić, A., Zelić, B., Microstructured devices for biodiesel production by transesterification, Biomass Conv. Bioref. 8(2018) 1-8
- [20] Kosar, V., Kemijsko reakcijsko inženjerstvo, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2017, str 5-6, 16-17
- [21] Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, T., Zelić, B., Mikroreaktori, Kem. Ind. 59 (2010)227-248
- [22] Zrnčević, S., Kataliza i katalizatori, Hinus, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2004, str. 23-31, 41-45
- [23] Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Sander, A., Zelić, B., Lipase catalysed biodiesel synthesis with integrated glycerol separation in continuously operated microchips connected in series, New Biotechnol. 47 (2018) 80-88
- [24] J. Milačić, Ekstrakcija glicerola iz biodizela sintetiziranog iz otpadnih ulja, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2016
- [25] Mildner, B., Enzimi-1, Osnove biokemije, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2020, str. 1-6
- [26] Matte, C.R., Bussamar, R., Dupont, J., Rodrigues, R.C., Hertz, F.P., Ayub, A.Z., Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobcad 150 Support: Characterization and Applications, Springer Science-Business Media, New York, 2014, str. 1-15

- [27] Bondioli, P., Bella, L.D. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107 (2005) 153-157
- [28] Budžaki, S., Šalić, A., Zelić, B., Tišma, M., Enzyme-catalysed biodiesel production from edible and waste cooking oils, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29 (2015)329-333
- [29] Kuhn, J., Müller, H., Salziga, D., Czermak P., A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation, *Electronic J. Biotech.* 18 (2015) 252-255
- [30] Gelinski, E. K., Hamerski, F., Corazza, M. L., Santos, A. F., Biodiesel synthesis monitoring using near infrared spectroscopy, *Open Chem. Eng. J.* 12 (2018) 95-110
- [31] Mutavdžić Pavlović, D., *Procesno instrumentalna analiza (nastavni tekstovi 2)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2015, str. 24-39
- [32] Felizardo, P., Baptista, P., Sousa Uva, M., Menezes, J.C., Neiva Correia, M.J., Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007) 97-105
- [33] Matijević, B., Blažić, M. Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka. *Mljekarstvo* 58 (2008) 151-169.
- [34] Gad, H. A., El-Ahmady, S. H., Abou-Shoer, M. I., Al-Azizi, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. *Phytochem. Analysis.* 24 (2012) 1-24.
- [35] Valinger, D., Benković, M., Jurina, T., Jurinjak Tušek, A., Belščak-Cvitanović, A., Gajdoš Kljusurić, J., Bauman, I. Use of NIR spectroscopy and 3D principal component analysis for particle size control of dried medicinal plants. *J. Process. Energ. Agricult.* 21 (2017) 17-22.
- [36] Funes, E., Allouche, Y., Beltran, G., Jimenez, A. A review: Artificial neural networks as tool for control food industry process. *J. Sensor Tech.* 5 (2015) 28 – 43
- [37] Huang, Y., Xiao, D., Burton-Freeman, B. M., Edirisinghe, I. Chemical Changes of Bioactive Phytochemicals during Thermal Processing, *Reference Module in Food Science* (2016) 1-7

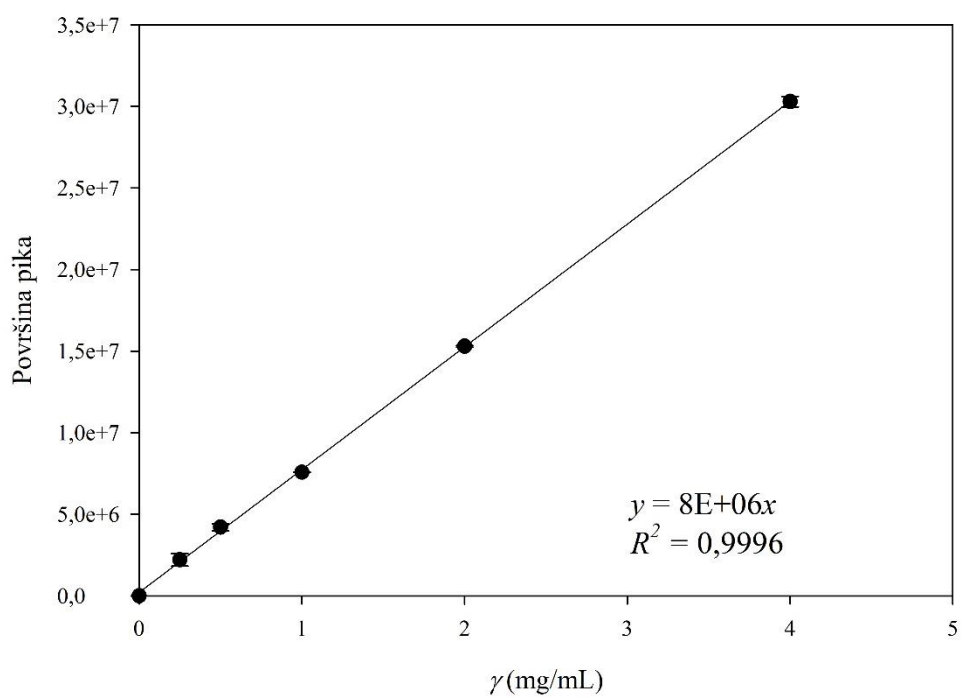
7. PRILOZI



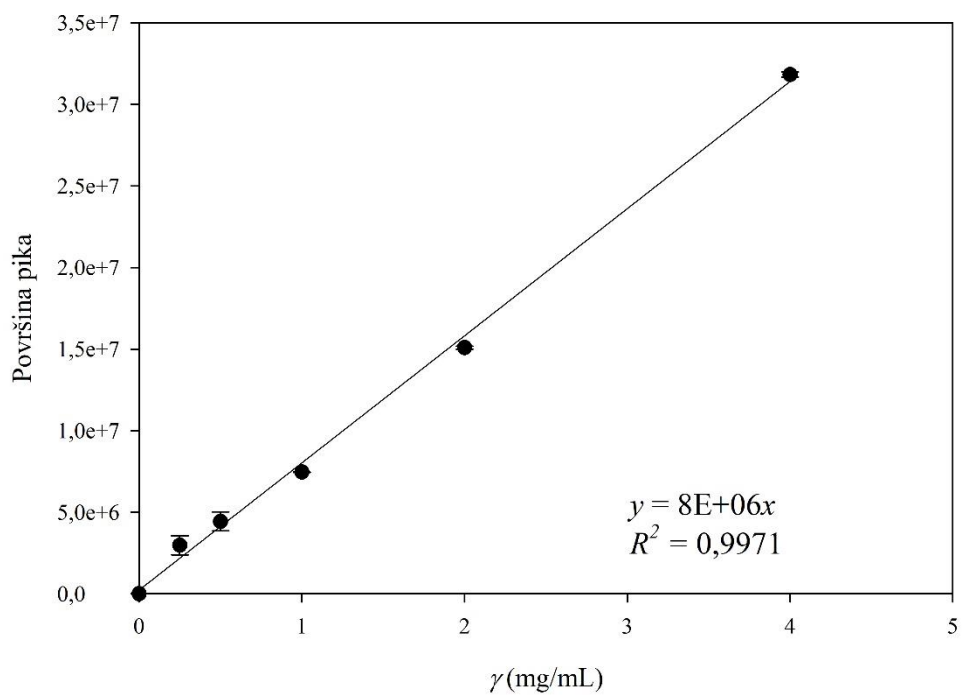
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola na spektrofotometru



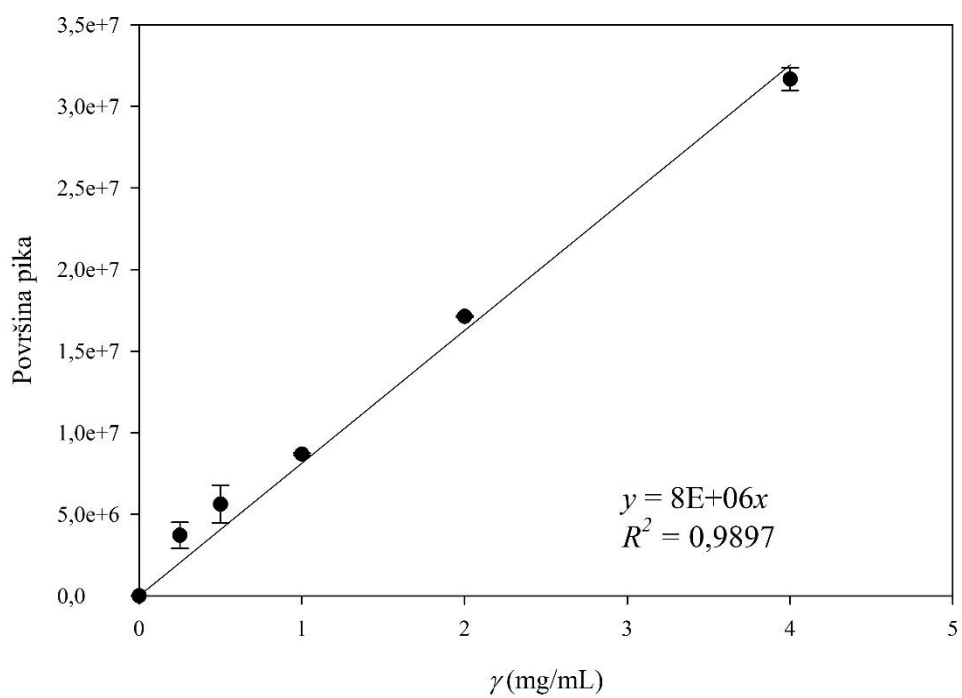
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola na plinskom kromatografu



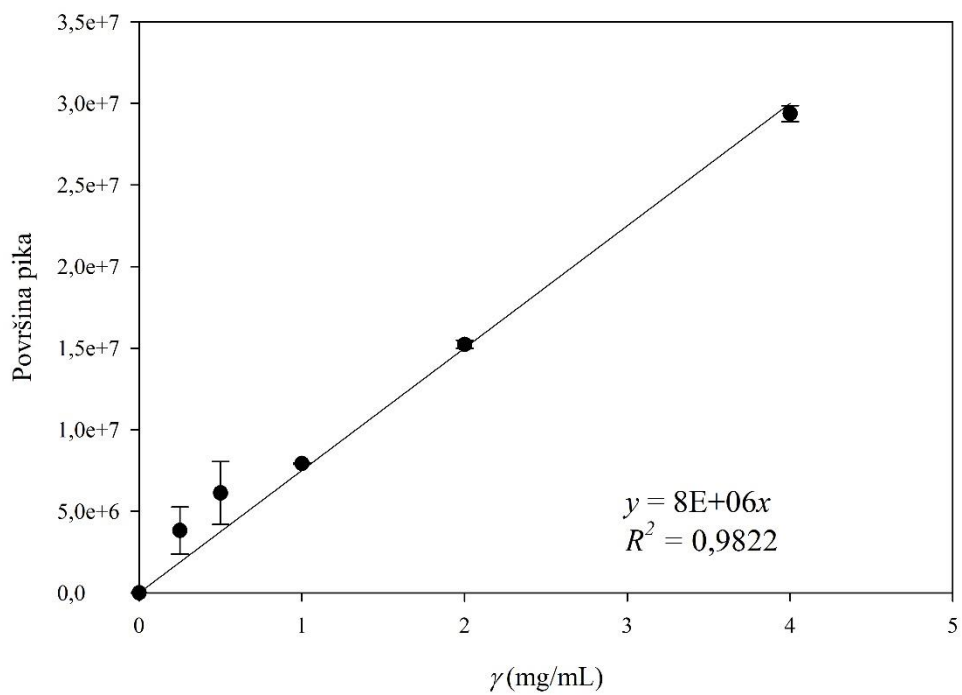
Prilog 3. Baždarni dijagram estera palmitinske kiseline



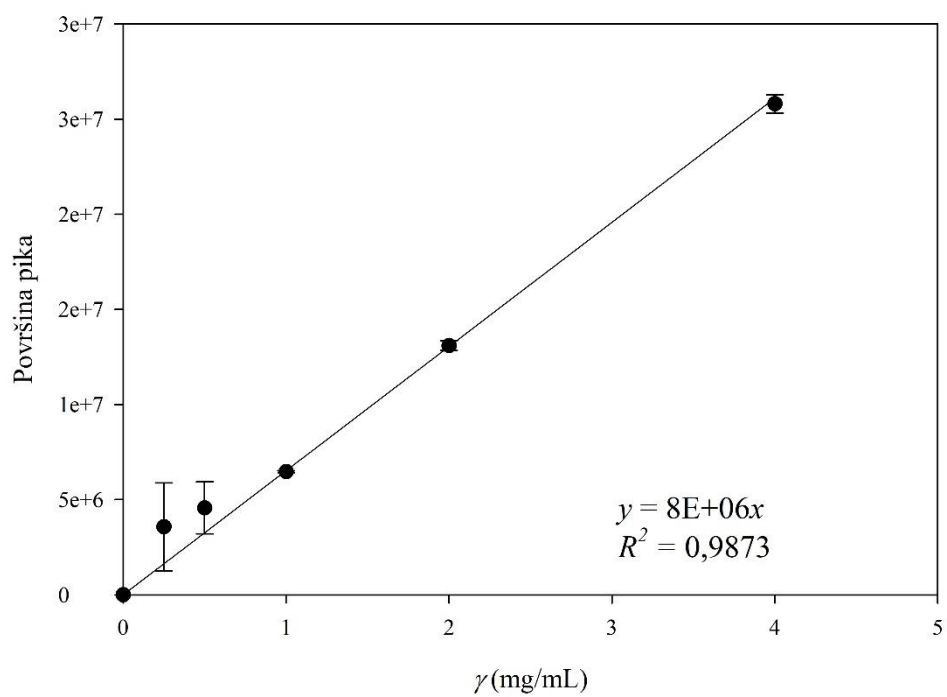
Prilog 4. Baždarni dijagram estera stearinske kiseline



Prilog 5. Baždarni dijagram estera oleinske kiseline



Prilog 6. Baždarni dijagram estera linolne kiseline



Prilog 7. Baždarni dijagram estera linoleinske kiseline

