Ekstrakcija i karakterizacija celuloze i lignina iz biljke Miscanthus giganteus

Bačinić, Anđela

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:665540

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

ANĐELA BAČINIĆ

EKSTRAKCIJA I KARAKTERIZACIJA CELULOZE I LIGNINA IZ BILJKE *MISCANTHUS x GIGANTEUS*

Diplomski rad

Zagreb, 2016

ANĐELA BAČINIĆ

EKSTRAKCIJA I KARAKTERIZACIJA CELULOZE I LIGNINA IZ BILJKE *MISCANTHUS x GIGANTEUS*

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
magistra prirodnih znanosti (kemija)

Zagreb, 2016

Ovaj diplomski rad izrađen je u Službi Centralni ispitni laboratorij INE d.d. pod vodstvom dr. sc. Jelene Parlov-Vuković, i u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Tomislava Jednačka.

Ovaj rad je izrađen 2016. godine pod vodstvom prof. dr. sc. Predraga Novaka i dr. sc. Jelene Parlov-Vuković te neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Tomislava Jednačaka. Zahvaljujem mentorima na predlaganju teme, prihvaćanju mojih želja, pomoći oko diplomskog, odgovorima na sva moja pitanja i trpljenju moje brzopletosti.

Zahvaljujem neposrednom voditelju dr. sc. Tomislavu Jednačku na pomoći oko snimanja NMR-a i obradi rezultata.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na pomoći oko diplomskog, susretljivosti tokom obrazovanja i brojnim savjetima.

Zahvaljujem cijelom timu CIL-a Ine d.d. na mnoštvu znanja, informacija i smijeha tokom izrade eksperimentalnog dijela. Posebno hvala mojoj dragoj Sanji Ivić, Nadi Uzorinac-Nasipak i dipl. ing. Tihani Goričnik.

Zahvaljujem Ani i Bubiju na praćenju svakog koraka svih 5 godina, ako idemo na doktorat idemo zajedno!

Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na uljepšavanju mog života.

Hvala mojim sestrama i mom najboljem dečku koji su dijelili sa mnom suze, smijeh, slavili sa mnom uspjehe i podizali me na noge tokom padova.

Najveće hvala mojoj mami što me pratila uz svaki moj ispit, proživljavala sa mnom brojne neprospavane noći i brinula više nego ja, bila mi najveća potpora, kao i mome tati koji je toliko žrtve stavio na sebe da bi ja bila tu gdje jesam. Ne bi ovog ničeg bilo bez vas!

Hvala svima koji su bili uz mene!

SADRŽAJ:

SAŽETAK VI
ABSTRACT VII
1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Biogoriva 4
2.2. *Miscanthus x giganteus* 5
2.3. Lignocelulozna biomasa 7
2.3.1. Celuloza 8
2.3.2. Hemiceluloza 9
2.3.3. Lignin 10
2.4. Proizvodnja bioetanola iz biomase 11
2.5.1. Ekstrakcija 13
2.5.2. Kromatografija 14
2.5.3.Vibracijska spektroskopija 15
2.5.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije 16
2.5.5. Digestija - metoda razaranja uzoraka 16
2.5.6. Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES) 17
2.5.7. Atomska apsorpcijska spektrometrija 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 18
3.1 . Određivanje sadržaja ekstraktivnih tvari 19
3.1.1. Određivanje sadržaja celuloze 20
3.1.2.Određivanje sadržaja lignina 21
3.2. Ionska kromatografija 22
3.2.1. Određivanje kationa ionskom kromatografijom 22
3.2.2. Određivanje aniona ionskom kromatografijom 23
3.3. Spektroskopija NMR 24
3.4. Spektroskopija IR 25
3.5. Mikrovalno razaranje 26

3.6. Elementna analiza biomase tehnikom ICP-OES 27
4. REZULTATI I RASPRAVA 29
4.1. Ekstrakcija slijepe probe 30
4.2. Ekstrakcija uzorka Miscanthusa x giganteusa 31
4.3. Određivanje sadržaja celuloze i lignina 33
4.4. Ionska kromatografija 35
4.5. Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu 39
4.6. Analiza rezultata spektroskopije IR 41
4.7. Analiza rezultata spektroskopije NMR 43
5. ZAKLJUČAK 50
6. LITERATURNA VRELA 52
7. ŽIVOTOPIS 56

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

EKSTRAKCIJA I KARAKTERIZACIJA LIGNINA I CELULOZE

IZ BILJKE *MISCANTHUS x GIGANTEUS*

Anđela Bačinić

Zavod za analitičku kemiju, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Iz uzorka biljke *Miscanthus x giganteus* ekstrahirane su glavne komponente lignocelulozne biomase lignin i celuloza. Dobiveni udio celuloze je 68,51 %, a lignina 27,34 %. Zbog velikog udjela celuloze iz koje se hidrolizom i fermentacijom proizvodi bioetanol, biljka *Miscanthus x giganteus* je pogodna sirovina za proizvodnju biogoriva.

Analiza uzorka biomase ionskom kromatografijom provedena je kako bi se odredile koncentracije K^+, Na^+ i Cl^- koji tijekom izgaranja biomase mogu stvarati taloge, prah ili aglomerate. Dobivene mase iona K^+, Na^+ i Cl^- po kilogramu biomase su 5287 mg, 2 mg i 674 mg. Optičkom emisijskom spektroskopijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES) određene su koncentracije makro- i mikroelemenata u biomasi zbog njihove toksičnosti ili mogućnosti stvaranja taloga.

Infracrvenom spektroskopijom (IR) i spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR) analizirani su uzorci lignina i celuloze u svrhu identifikacije i strukturne karakterizacije. Spektar IR snimljen je u srednjem području zračenja IR od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1}, metodom KBr pastile. Spektri ^1H NMR i DOSY snimljeni u DMSO-d_6. Snimljeni su i spektri u čvrstom stanju korištenjem tehnike ^{13}C CP/MAS NMR. Dobiveni spektri uspoređeni su s onima iz literature.

(55 stranice, 25 slike, 15 tablice, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102 a, Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi: biogorivo/ IC / ICP-OES/ IR/ lignocelulozna biomasa/ Miscanthus giganteus/ NMR

Mentori : Dr. sc. Jelena Parlov-Vuković, zn. sur.
Dr. sc. Predrag Novak, red. prof.
Ocjenitelji : Dr. sc. Predrag Novak, red. prof.
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.
Dr. sc. Biserka Prugovečki, izv.prof.
Zamjena : Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, izv.prof.
Rad prihvaćen : 28. 09. 2016.

ABSTRACT

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma thesis

EXTRACTION AND CHARACTERIZAION OF THE CELLULOSE AND LIGNIN FROM THE PLANT *MISCANTHUS x GIGANTEUS*

Anđela Bačinić

University of Zagreb, Faculty of Science,
Laboratory of Analytical Chemistry,
Zagreb, Croatia

Main components of lignocellulosic biomass lignin and cellulose were extracted from the plant *Miscanthus x giganteus*. The obtained mass fraction of cellulose and lignin were 68.51 % and 27.34 %, respectively. Owing to the large mass fraction of cellulose, from which bioethanol is produced by hydrolysis and fermentation, the plant *Miscanthus x giganteus*is is suitable raw material for the production of biofuels.

In order to determine concentration of K^+, Na^+ and Cl^-, which may form deposits, powders or agglomerates during combustion process, ion chromatography was used. The obtained ion masses of K^+, Na^+, Cl^- per weight of biomass kilogram were 5287 mg, 2 mg and 674 mg, respectively. By using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), concentrations of microelements and macroelements in biomass were determined, since they are toxic and may form residues.

Infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies were applied to identify and structurally characterized samples of lignin and cellulose. IR spectrum recorded by using KBr pellets in the middle IR region (4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1}) displayed vibrational modes characteristic of lignin and cellulose. ^1H NMR and DOSY spectra recorded in DMSO-d_6 have confirmed the presence of lignin and cellulose in the samples. Furthermore, spectra in the solid state were also recorded by using ^{13}C CP/MAS NMR technique. All recorded spectra were compared with those reported in the literature.

(55 pages, 25 figures, 15 tables, 46 references, original in Croatian)
Thesis deposited at the Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102 a, Zagreb, Croatia
Keywords: biofuel/ IC/ ICP-OES/ IR/ lignocellulosic biomass/ Miscanthus giganteus/ NMR
Supervisors: : Dr. sc. Jelena Parlov-Vuković, Research associate
Dr. sc. Predrag Novak, Full Professor
Reviewers: : Dr. sc. Predrag Novak, Full Professor
Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor
Dr. sc. Biserka Prugovečki, Associate Professor
Replacment : Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
Thesis accepted : 28. 09. 2016.

1. UVOD

Na globalnoj razini sve je veća potreba za energijom, hranom i gospodarskim razvojem. Zalihe nafte sa većim udjelom lakših frakcija se smanjuju, a eksploatacija postaje skuplja. Da bi se smanjili troškovi dolazi do sve intenzivnije potrage za alternativnim izvorima energije. Jedan od alternativnih izvora je i lignocelulozna biomasa sa visokim udjelom celuloze koja se fermentacijom prevodi u bioetanol koji služi kao zamjena za biobenzin. *Miscanthus x giganteus* je biljka porijeklom iz Azije koja sadrži visoki udio celuloze ≈70 %. Može se uzgajati na degradiranom zemljištu, te se na taj način izbjegava korištenje usjeva namijenjenih za ljudsku i životinjsku prehranu. Jednom posađen *Miscanthus* može rasti 15-20 godina bez potrebe za velikom obradom. Alternativno gorivo pogodno je i s financijskog i ekološkog aspekta. Cilj ovog diplomskog rada bio je identifikacija i karakterizacija biljke *Miscanteus x giganteus* s područja Zagrebačke županije. Napravljena je ekstrakcija te je određen sadržaj glavnih komponenata od kojih je biljka građena, celuloze i lignina. Tehnikom ionske kromatografije određen je udio iona K^+, Cl^- i Na^+ koji nastaju izgaranjem biomase, a mogu stvarati taloge, prah ili aglomerate. Tehnikom optičke emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu određene su ukupne koncentracije mikro- i makroelemenata unutar biomase. Kombinacijom podataka dobivenih tehnikama infracrvene spektroskopije i nuklearne magnetske rezonancije identificirane su karakteristične funkcijske skupine.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biogoriva

Biogoriva su sva tekuća, plinovita ili kruta goriva proizvedena iz biomase [1]. Biodizel je alternativno gorivo za dizelske motore čija je proizvodnja i primjena značajna s ekološkog aspekta. Biodizelsko gorivo se proizvodi iz biljnih ulja, životinjskih masti te rabljenog ulja esterifikacijom metanolom. Fizikalna svojstva biodizela su vrlo slična svojstvima mineralnih goriva. Biodizel se može koristiti kao čisto gorivo ili kao primjesa s dizelom bez potrebe za modifikacijom motora [2]. Bioetanol je obnovljiv izvor energije, dobiva se procesom fermentacije iz jednostavnih šećera. Služi kao zamjena za benzin. Sve se više koristi kao alternativno gorivo. Proizvodnja bioetanola iz biomase je jedan od načina kako smanjiti potrošnju nafte i zagađenje atmosfere. Moguća je njegova uporaba u suvremenim automobilima bilo u obliku čistog bioetanola ili kao primjese s benzinom. Sirovine za prvu generaciju biogoriva su na bazi škroba i saharoze. Zbog visoke cijene usjeva i činjenice da se te sirovine koriste za ljudsku i životinjsku prehranu, prva generacija goriva nije isplativa. Bioetanol dobiven iz lignocelulozne biomase predstavlja gorivo druge generacije [3]. Treću generaciju biogoriva čine goriva dobivena iz mikroalgi i makroalgi [1]. Kao alternativan izvor energije koriste se energetske kulture. S obzirom da se sirovine za prvu generaciju biogoriva kao što su kukuruz, šećerna repa, pšenica, uljarice koriste za prehranu, zahtijevaju kvalitetno tlo i posebnu agronomsku brigu došlo je do razvoja druge generacije biogoriva. Sirovine za drugu generaciju biogoriva kao što su drvo, organski otpad, vodena vegetacija, poljoprivredna biomasa i ostaci, gnojiva životinjskog podrijetla, razne energetske lignocelulozne kulture u koje se ubraja i *Miscanthus x giganteus* (Slika 1.) mogu se uzgajati na zemljištu slabije kvalitete, degradiranom zemljištu te se tako izbjegne korištenje usjeva za ljudsku prehranu i korištenje kvalitetnog tla [3,5]. Fosilna goriva su nafta, zemni plin i ugljen. Njihovim sagorijevanjem dolazi do povećane koncentracije CO_2 u atmosferi što uzrokuje efekt staklenika i dovodi do globalnog zagrijavanja [3]. Fosilna goriva čine 95% globalnog tržišta u sektoru transporta. Proizvodnja biogoriva raste po stopi od 15 % godišnje, što je stopa porasta deset puta veća od stope porasta proizvodnje nafte. Na globalnoj razini povećava se potreba za hranom, energijom i gospodarskim razvojem. Eksploatacija nafte postaje skuplja zbog smanjenja prirodnih izvora energije pa dolazi do sve intenzivnijeg istraživanja alternativnih izvora energije. Alternativni izvori omogućuju smanjenu ovisnost

zemalja o uvozu nafte i naftnih derivata, smanjenje emisije stakleničkih plinova i toksičnih tvari u atmosferu, te doprinose razvoju ruralnih sredina [3, 5]. Alternativno gorivo prikladno je kako s financijskog, tako s i ekološkog aspekta. Direktivom (2003/30/EC) o alternativnim gorivima Europska unija se obavezala da će do 2020. godine 20 % tradicionalnih goriva u prometu zamjeniti alternativnim. Zahtjevi su obavezujući pa su ih članice Europske unije prihvatile. Direktiva se odnosi i na buduće članice Europske unije [6]. Biljna biomasa omogućuje smanjenje globalnog zagrijavanja na način da koristi CO_2 u procesu fotosinteze te daje čistije produkte sagorijevanja od fosilnih goriva [3]. Proizvodnjom biogoriva iz biomase smanjuje se eksploatacija nafte i zagađenje životne sredine.

2.2. *Miscanthus x giganteus*



Slika 1. Usporedba polja u Ilinoisu *Miscanthus x giganteusa* i *Panicum virgatuma* [30]

Miscanthus x giganteus je visokokvalitetna lignocelulozna biomasa koja se koristi za proizvodnju biogoriva. Poznato je oko 17 vrsta višegodišnjih rizomatskih trava roda *Miscantheus*. Porijeklom su iz tropskih i subtropskih područja Azije. Interes za njih kao potencijalnu biomasu za proizvodnju biogoriva započinje 1990-ih godina. 1930. godine je prvi puta dovedena iz Japana i kultivirana u Europi. 1980-ih godina u Europi i to u Danskoj, Njemačkoj, Irskoj i Velikoj Britaniji započinju istraživanja na *Miscanthusu* [5]. *Miscanthus x giganteus* je sterilni triploidni hibrid nastao križanjem *Miscanthus sinesis* (diploid) i *Miscanthus saccarriflourus* (tetraploid). Sterilan je jer sadrži tri para kromosoma,

te se tako sprječava normalno sparivanje kromosoma potrebno da se formira plodna pelud [7]. Spada u skupinu C4 biljaka koje apsorbiraju nadprosječnu količinu CO_2 (30 t/ha). C4 višegodišnje biljke predstavljaju kvalitetnu energetsku kulturu. Efikasno iskorištavaju dostupne resurse u tlu i vodi, zadržavaju ugljik u tlu, nisu invazivne, optimalno rastu pri višim temperaturama (30-45˚C), rekultiviraju tlo na kojem se nalaze te koriste više sunčeva zračenja za stvaranje ugljika (6,7 %) od C3 biljaka (3,3 %) [5]. *M. giganteus* najbolje uspijeva i postiže najbolje prinose u području umjerene klime. Kultura zahtjeva izravnu sunčevu svjetlost i vlažno plodno tlo. Otporna je na hladnoću i vjetrovitu klimu. Najpogodnije tlo za uzgoj je s pH oko 5 [8]. *M. giganteus* je višegodišnja biljka. Nakon sadnje biljka se svake godine sama obnavlja te iz istog korijena raste 15-20 godina. Razmnožavanje je moguće samo sadnicama ili rizomima. Sadnice *M. giganteus* mogu se razmnožavati samo "*in vitro*". Biljka je neplodna pa se ne može razmnožavati niti širiti izvan plantaža. Uzgoj i žetva biljke su jednostavni. Stabljika se zimi suši, a žetva je nakon otpadanja lišća (između siječnja i travnja). Za postizanje maksimalne stope prinosa potrebno je 3-6 godina. Nakon 3 godine prosječni prinos je oko 20 t/ha suhe tvari. Ne zahtjeva znatna agronomska ulaganja (oranje, sadnja, gnojenje). Nakon 1. vegetativne sezone naraste do 3.5 m, dok nakon 3. vegetativne sezone naraste oko 4 m [7]. Zbog sposobnosti da u jesenskom periodu vrši translokaciju dušikovih i drugih spojeva u rizome, *M. giganteus* može davati visoki prinos u periodu od 15 godina bez dodavanja gnojiva ili uz minimalan dodatak. Osim toga biljka je otporna na bolesti i štetnike [3]. Prednosti *Miscanthus x giganteusa* su što može rasti na zagađenom području i na području niske kvalitete što omogućava uzgoj prehrambenih biljaka na kvalitetnom području. Na taj način omogućava se zaštita okoliša i prirodnih resursa, te se poboljšava kvaliteta tla. Na slici 2. je prikaz biomase *Miscanthusa x giganteusa* nakon žetve. Osim za proizvodnju biogoriva *M. giganteus* koristiti se za proizvodnju energije, papira, građevinskog materijala, kemikalija, te za proces kompostiranja [3,5].



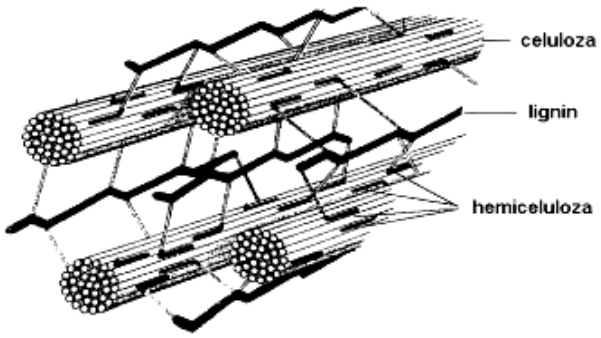
Slika 2. Biomasa *Miscanthusa x giganteusa* za proizvodnju biogoriva prije mehaničke obrade

2.3. Lignocelulozna biomasa

Lignocelulozna biomasa je obnovljivi izvor energije. Može se koristiti za proizvodnju toplinske i električne energije, te za proizvodnju biogoriva. Biomasa se dijeli na energetske biljke, njihove ostatke i otpad. Pod energetske biljke ubrajaju se drveće, višegodišnje trave i usjevi, pod ostatke razni šumarski, poljoprivredni, stočarski i industrijski ostatci, a najviše ostaci drvne industrije. Otpad se odnosi na čvrsti komunalni otpad.

Miscanthus x giganteus sadrži veliku količinu biomase [3].

Lignocelulozu biomasu čine tri glavne komponente lignin, celuloza i hemiceluloza. Na slici 3. se nalazi shematski prikaz rasporeda komponenti lignocelulozne biomase unutar stanične stijenke. Stanična stijenka je izgrađena od lignocelulozne biomase. Celuloza unutar lignocelulozne biomase čini kristalnu vlaknastu strukturu i izgleda kao jezgra kompleksa. Hemiceluloza se nalazi između mikro- i makrofibrila celuloze. Lignin ima strukturnu ulogu kalupa u koji su ugrađeni celuloza i hemiceluluza.



Slika 3. Shematski prikaz stanične stijenke biljke [12]

Termin "lignocelulozna biomasa" se koristi kada se govori o visokim biljkama, mekom i tvrdom drveću. Najvažnija svojstva lignocelulozne biomase jesu vrlo dobra čvrstoća, zapaljivost, biorazgradivost i reaktivnost. Sastav lignocelulozne mase ovisi o izvoru [10].

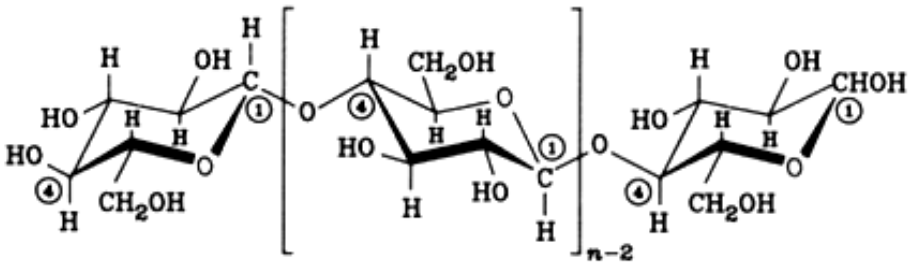
Tablica 1. Sastav lignocelulozne mase u suhom uzorku iz različitih izvora [31]

Lignocelulozni materijal	Celuloza %	Hemiceluloza %	Lignin %
Tvrdo drvo	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Meka stabljika	40 - 50	25 - 35	25 - 35
Ljuska oraha	25 - 30	25 - 30	30 - 40
Lišće kukuruza	45	35	15
Trava	25 - 40	35 - 50	10 - 30
Papir	85 - 44	0	0 - 15
Slama	30	50	15

Lignocelulozna masa je kompleksna smjesa te je izuzetno važno poznavanje njenog sastava i fizikalnih svojstava.

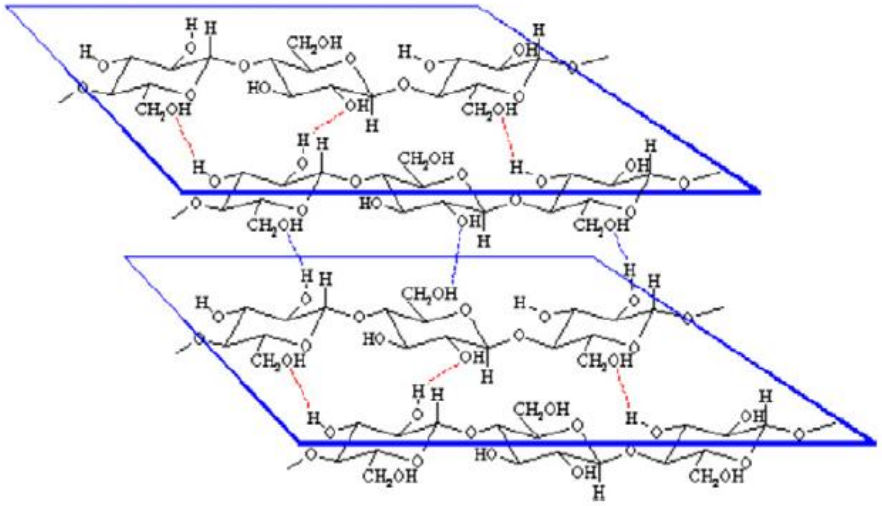
2.3.1. Celuloza

Kemijska formula celuloze je $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celuloza je β-1,4-poliacetal celobioze (4-O-β-D-glucopiranozil-D-glukoza). Polimer je glukoze. Na slici 4. prikazana je struktura jednog lanca celuloze.



Slika 4. Struktura lanca celuloze [11]

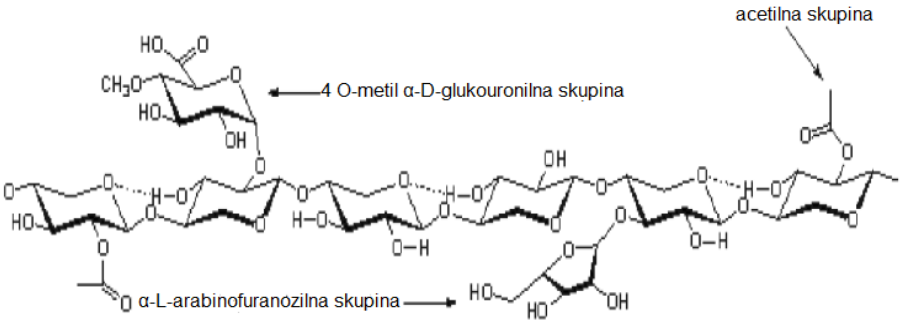
Svojstva celuloze ovise o stupnju polimerizacije i njenoj kristaliničnosti. Zbog veza između molekula glukoze (β-1,4 glikozidne) moguće je povezivanje u duge lance. Između hidroksilnih skupina koje se nalaze na obje strane molekule glukoze nalaze se vodikove veze. Veze utječu na raspored molekula u prostoru i povezivanje paralelnih lanaca. Na slici 5. prikazano je povezivanje lanaca vodikovim vezama.



Slika 5. Paralelno povezivanje lanaca celuloze vodikovim vezama [11]

2.3.2. Hemiceluloza

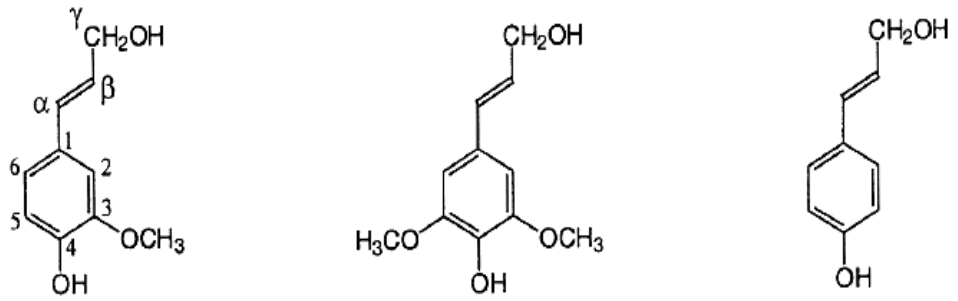
Hemicelulozu čini skupina polisaharida koji se nalaze u staničnom zidu biljke te ima niski stupanj polimerizacije (50-300). Polisaharidi se razlikuju ovisno o izvoru. Vrste polisaharida su ksilan, glukuronooksilan, arabinoksilan, glukomanan i ksiloglukan. Hemicelulozu nije moguće izolirati u kristalnom obliku uglavnom zbog razgranate strukture i acetilnih skupina povezanih s polimernim lancem. Struktura lanca hemiceluloze prikazana je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz strukture hemiceluloze [11]

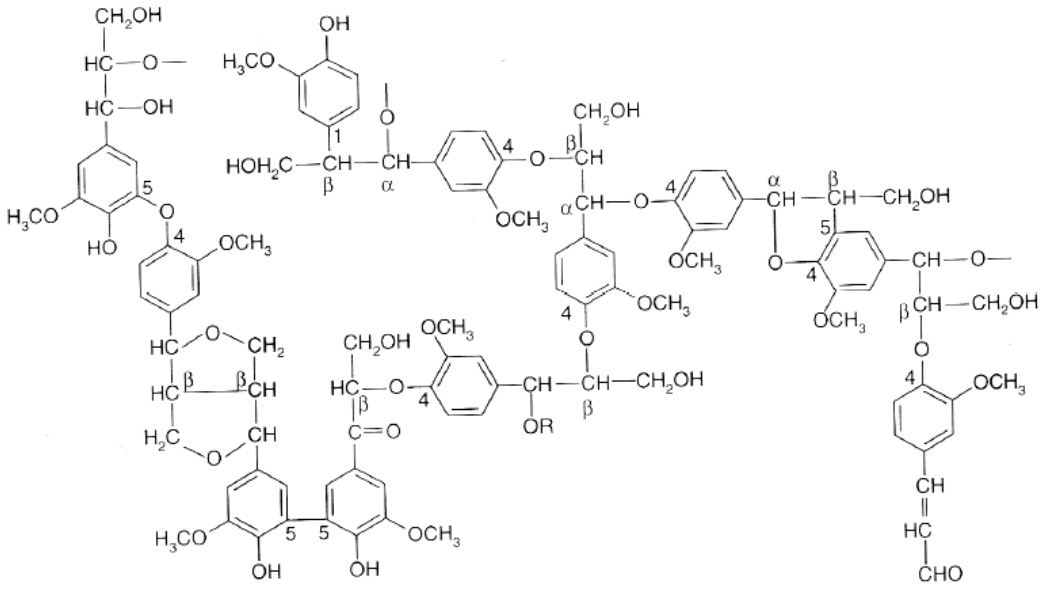
2.3.3. Lignin

Lignin je najkompleksniji prirodni polimer. To je trodimenzijski polimer čije su dominantne građevne jedinice : *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol (Slika 7).



Slika 7. Građevni elementi lignina, s lijeva na desno koniferil, sinapil i *p*-kumaril alkohol [32]

Svojsto lignina je i polidisperzivnost. Na slici 8. prikazano je različito granjanje i povezivanje u sličnim molekulama lignina. Građevni elementi lignina *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol povezuju se eterskim vezama (β-O-4´, α-O-4´) i ugljik-ugljik vezama (β-β´, β-5´, 5-5´), te grade trodimenzijsku mrežu.



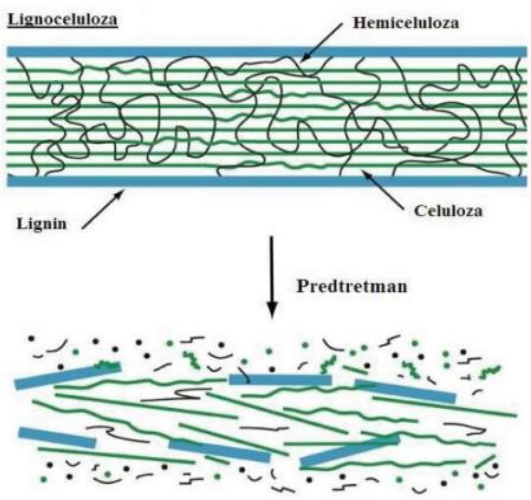
Slika 8. Shematski prikaz strukture lignina [32]

Lignin u biljci čini netopljivu trodimenzijsku mrežu koja je bitna za izdržljivost i razvoj stanice, omogućuje transport vode i hranjivih tvari, metabolita do biljnih stanica. Mreža gradi

kompozitni materijal te kao takva služi kao vezivo između stanica. Ima izuzetnu otpornost na udarce, pritiske i savijanje [10,11].

2.4. Proizvodnja bioetanola iz biomase

Da bi se omogućilo djelovanje enzima koji prevode ugljkovodične polimere u fermentabilne šećere, iz lignocelulozne biomase potrebno je osloboditi celulozu. Celuloza i hemiceluloza se hidroliziraju u fermetabilne šećere koji se dalje fermentiraju u bioetanol. Lignocelulozna biomasa je kompleksna struktura te se njeno prevođenje u bioetanol sastoji od tri koraka. Prvo je potrebno primjeniti različite predtretmane biomase. Predtretman djelomično ili potpuno hidrolizira hemicelulozu i zadržava reaktivnu glukozu. Omogućuje bolju razgradnju sirovina, te uklanjanja lignin čija velika količina može utjecat kao inhibitor. Smanjuje količinu kristalne celuloze i poboljšava hidrolizu. Predtretman mora izbjeći moguću razgradnju ili gubitak ugljikohidrata i tvorbu nusprodukata koji mogu inhibirat daljne procese. Predtretmani se provode prije drugog koraka koji čini hidroliza celuloze i hemiceluloze. Treći korak je fermentacija jednostavnih šećera u biogorivo. Odabir predtretmana ovisi o sastavu biomase i mogućim nusproduktima nastalnih predtretmanom. Predtretmanom se želi postići bolja iskoristivost sirovine i veći prinos bioetanola, ali predtretmani su skupi pa je i proizvodnja tehnološki zahtjevna i skupa. Predtretmani se dijele na fizikalne (mehaničko usitnjavanje (Slika 10), piroliza, ultrazvučni predtretman), kemijske (predtretman vrućom vodom, kiselinska hidroliza, alkalna hidroliza, predtretman organskim otapalom, oksidativna delignifikacija, predtretman ionskim tekućinama na sobnoj temperaturi), fizikalno-kemijske (eksplozija vodenom parom, eksplozija amonijakom, eksplozija s CO_2) i biološke predtretmane. Na slici 9. prikazano je kako predtretman djeluje na biomasu. Predtretman smanjuje veličinu čestica i na taj način omogućavaju lakše rukovanje, te povećava aktivnu površinu.



Slika 9. Razgradnja lignocelulozne biomase predtretmanima[12]



Slika 10. Mehanički usitnjeni uzorci *Miscanthusa*

Za biološke predtretmane se koriste bijele i smeđe meke gljivice koje služe za razgradnju lignina, celuloze i hemiceluloze. Koriste se za biomasu koja sadrži visok udio vode. Mogu se koristiti i pri povišenoj temperaturi. Prednosti bioloških predtretmana su malen utrošak energije, blagi uvjeti i nekorištenje štetnih kemikalija. Nedostaci su mala brzina hidrolize pa je proces spor [3,11,12].

2.5. Analitičke tehnike

Analitičke tehnike korištene u ovom diplomskom radu su ekstrakcija, ionska kromatografija, infracrvena spektroskopija, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, tehnika

razaranja, optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu, atomska apsorpcijska spektrometrija.

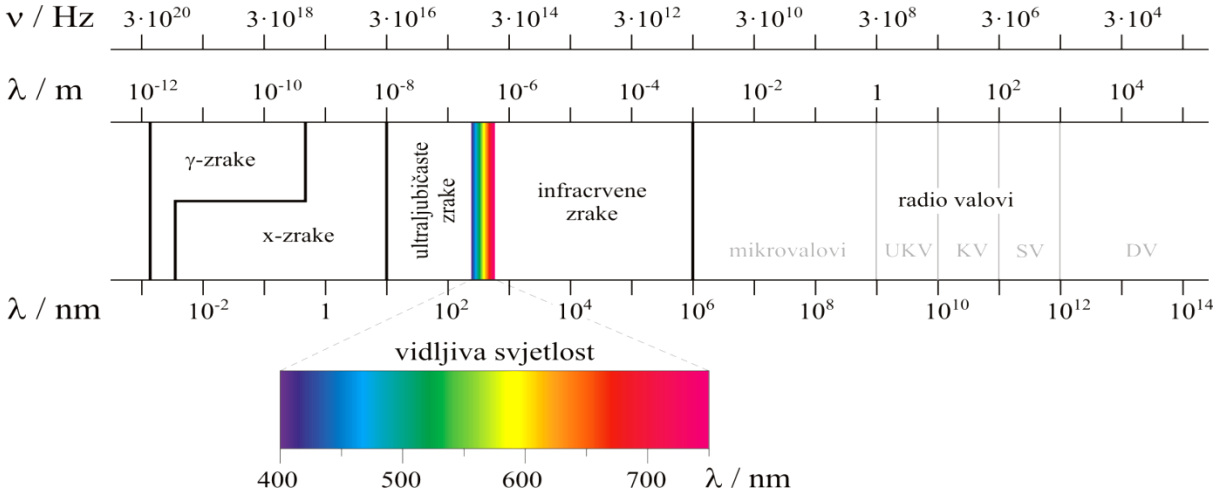
2.5.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda izolacije i pročišćavanja analita od interesa iz otopine, suspenzije, emulzije ili čvrste tvari korištenjem pogodnog otapala koje se ne miješa s otopinom, a služi za direktnu izolaciju prirodnih spojeva iz biološkog materijala. Otapala koja se koriste mogu biti hlapljiva (petroleter, dietil-eter, pentan, heksan, metanol, diklormetan..), nehlapljiva (ulja i masti) i fluidi pri superkritičnim uvjetima (CO_2, voda, etanol...). Izbor otapala ovisi o selektivnosti, toksičnosti, zapaljivosti, temperaturi vrenja i stabilnosti. Nedostaci ekstrakcije su vjerojatnost nastajanja visokomolekulskih hlapljivih i nehlapljivih tvari u ekstraktu, mogućnost kontaminacije uzorka otapalom te vjeroatnost da tijekom uklanjanja otapala dođe do gubitka hlapljivih sastojaka. Nedostatak je i potreba za daljnom obradom ekstrakata sušenjem, koncentriranjem ili kromatografijom. U ovom diplomskog radu korištena je ekstrakcija čvrsto-tekuće. Ekstrakcija čvrsto-tekuće služi za pripravu, izoliranje i ukoncentriravanje uzoraka. Ekstrakcija organskih tvari iz čvrste faze može se provest na sobnoj temperaturi ili pri povišenoj temperaturi. Pri sobnoj temperaturi provode se maceracija (jednokratna ekstrakcija) i perkoliranje (jednakomjeran protok otapala kroz stupac biljnog materijala u perkolatoru). Procesi koji se provode pri povišenoj temperaturi su zagrijavanje analita s otapalom u aparaturi s povratnim hladilom (refluksiranje), i filtriranje ili dekantiranje vruće otopine. Pri povišenoj temperaturi provodi se i ekstrakcija po Soxhletu, pri kojoj se otapalo zagrijava u okrugloj tikvici, pare otapala se kondenziraju i kapaju na uzorak smješten u staklenom ili celuloznom cilindru u gornjem dijelu aparature. Prednost ekstrakcije po Soxhletu je konstantan kontakt uzorka sa otapalom, pa se analit ne razgrađuje pri umjerenim uvjetima. Nedostatak su velika količina otapala, dugo vrijeme ekstrakcije (12-48 sati), ukoncentriravanje analita nakon ekstrakcije, moguć gubitak analita pri visokoj temperaturi, te činjenica da se osim analita često ekstrahiraju interferencije koje je potrebno dodatno pročistiti. Automatizirana ekstrakcija po Soxhletu je brža, omogućuje kontakt uzorka i otapala pri temperaturi vrelišta, a potrebna je i manja potrošnju otapala [14,15].

2.5.2. Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije sastojaka smjese. Separacija se provodi na temelju razdiobe sastojaka između mobile ili pokretne i stacionarne ili nepokretne faze. Mobilna faza može biti tekućina (tekućinska kromatografija), plin (plinska kromatografija) ili fluid pri superkritičnim uvjetima (fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima). Stacionarna faza može biti krutina, gel ili tekućina. Ukoliko je tekućina stacionarna faza ona može biti vezana na čvrstom nosaču, bilo da je imobilizirana ili kemijski vezana kovalentnom vezom. Uzorak za kromatografiju mora biti topljiv u mobilnoj fazi. Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na kolonske (stacionarna faza nalazi se na koloni) i plošne (stacionarna faza je na čvrstoj podlozi). Tijekom propuštanja smjese sastojci prelaze iz mobilne faze u stacionarnu i obrnuto do postizanja ravnoteže. Brzina dolaska sastojaka na detektor ovisi o njihovom zadržavanju u stacionarnoj fazi. Prema mehanizmu odvajanja kromatografija se dijeli na adsorpcijsku (razdvajanje sastojaka na površini čvrstog adsorbensa), razdjelnu (razdvajanje na temelju različite topljivosti sastojaka smjese u stacionarnoj i mobilnoj fazi), kromatografiju isključenjem (razdvajanje na temelju razlike u veličini i/ili obliku molekule ili razlike u naboju), afinitetnu (razdvajanje na temelju specifične biološke interakcije analita i liganda) i ionsko-izmjenjivačku (razdvajanje se temelji na razlici afiniteta sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni). Ionska kromatografija koja je korištena u ovom radu je vrsta tekućinske kromatografije. Služi za razdvajanje ionskih i jako polarnih analita. Danas se odvija u kolonama visoke djelotvornosti punjenim fino usitnjenim zrncima ionskog izmjenjivača uz uporabu konduktometrijskih, elektrokemijskih ili spektroskopskih detektora. Ionske izmjenjivače čine polimerne tvari velike molekulske mase s funkcijskim skupinama. Danas se sve više koristi priprava eluensa *on-line*, što omogućuje uštedu vremena i napora, veću čistoću eluensa i veću pouzdanost analize. Ionska kromatografija kao tehnika omogućuje bržu analizu, kvalitetnije rezultate i jednostavnost instalacije, veći izbor kolona i detektora te kontrolu varijabli koje mogu utjecat na kvalitetu, točnost i ponovljivost rezultata analize. Koristi se za analizu vode, pića, hrane, biogoriva, lijekova itd [15,16].

2.5.3.Vibracijska spektroskopija



Slika 11. Spektar elektromagnetskog zračenja [40]

Spektoskopija općenito proučava interakciju tvari s elektromagnetskim zračenjem. Spektar elektromagnetskog zračenja podijeljen je na nekoliko područja od γ-zračenja velike energije do radiovalova male energije (Slika 11). Ljudsko oko vidi samo dio vidljivog zračenja. Prilikom interakcije elektromagnetskog zračenja i tvari može doći do apsorpcije, emisije ili raspršenja elektromagnetskog zračenja. Vibracijska spektroskopija proučava interakcije infracrvenog dijela spektra elektromagnetskog zračenja s tvari i jedna je od najkorištenijih analitičkih tehnika koja služi za identifikaciju molekula na temelju njihovih vibracija. Infracrveno zračenje je zračenje valnih duljina u području od 800 do $1 \cdot 10^6$ nm. Spektroskopija IR se temelji na interakciji tvari i elektomagnetskog zračenja u infracrvenom dijelu spektra. Energija upadnog zračenja jednaka je energiji vibracija atoma u molekulama. Područje zračenja IR može se podijeliti na blisko (12500 cm^{-1} do 4000 cm^{-1}), srednje (4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1}) i daleko (400 cm^{-1} do 10 cm^{-1}). Za analizu organskih spojeva koristi se srednje područje infracrvenog spektra gdje se nalaze vrpce karakteristične za pojedine spojeve. Srednje područje IR može se podijeliti na područje funkcijskih skupina (4000 cm^{-1} do 1400 cm^{-1}) i područje otiska prsta (1400 cm^{-1} do 400 cm^{-1}) [17,18,19].

2.5.4. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) koristi se za identifikaciju i određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula. Atomske jezgre koje imaju neparan broj protona i neutrona (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P) imaju magnetski moment i spin različit od nule pa će imati i svoj spektar NMR, dok jezgre sastavljene od parnog broja protona i neutrona (^{16}O, ^{28}Si) nemaju magnetski moment, pa ne pokazuju efekt NMR. NMR spektroskopija omogućava i istraživanje strukturne okoline pojedinačnih jezgara, posebno vodika i ugljika. Jednodimenzijskim NMR tehnikama kao što su ^{1}H, ^{13} C, APT, INEPT, DEPT, PENDANT dobivamo spektre koji prikazuju ovisnost intenziteta signala o kemijskom pomaku. ^{1}H NMR nam daje informaciju o okolini vodikovih atoma u molekuli. Detektiraju se signali kemijski neekvivalentnih protona. Broj neekvivalentnih protona proporcionalan je omjeru integrala površine ispod pojedinog signala. Najčešće korištene dvodimenzijske NMR tehnike su COSY, DQF-COSY, TOCSY, HMQC, HSQC i HMBC. COSY je najjednostavnija homonuklearna dvodimenzijska tehnika. Koristi se za dobivanje informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege kroz najčešće dvije ili tri kemijske veze. DOSY spektroskopija koristi se za istraživanje smjese spojeva. Spektroskopija NMR u čvrstom stanju služi za identifikaciju i strukturnu karakterizaciju dobivenih spojeva u polikristalnim smjesa [20,21,22].

2.5.5. Digestija - metoda razaranja uzoraka

Digestija je proces taljenja uzorka pomiješanog s nekim sredstvom za taljenje. Bitna karateristika digestije jest visoka temperatura. Pri visokoj temperaturi kemijski reagiraju ioni iz uzorka i sredstvo za taljenje (kiseline ili baze) te nastaju novi spojevi koji su topivi u kiselinama ili vodi. Temperatura smanjuje vrijeme digestije sa nekoliko sati na minute. Potrebna je velika količina sredstva za digestiju kako bi popucale veze u kristalnim rešetkama uzorka. Postoje dvije metode digestije, mokra i suha digestija. Vrsta digestije korištena u ovom diplomskom radu jest mokra digestija pomoću mikrovalnog zračenja. Karakterizira je direktni prijenos topline na uzorak što omogućava kontrolu procesa. Prednost ove tehnike je mogućnost programiranja različitih metoda ovisno o uzorku, sigurnost rada pri atmosferskom tlaku, smanjeno vrijeme digestije, manja količina uzorka i reagensa. Ova

tehnika se primjenjuje za razgradnju uzoraka hrane, pića, stijena, biomase, tla, sedimenta, farmaceutskih proizvoda, međuproizvoda, polimera, tekstila itd [23,24].

2.5.6. Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-OES)

Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu je vrsta atomske emisijske spektrometrije koja se temelji na detekciji emitiranih valnih duljina karakterističnih za različite elemente. Plazma je visoko ionizirani plin koji se sastoji od nabijenih i metastabilnih čestica. Temperatura plazme je od 6000 do 10000 K. Temperatura koju postiže dovoljno je velika za pobudu većine elemenata koji emitiraju karakterističnu svjetlost, dovoljna je i za prevenciju formiranja većih interferencija. ICP-OES je tehnika koja se često koristi za detekciju i analizu elemenata u tragovima. Jedna je od najvažnijih tehnika za elementnu analizu uzoraka različitog izvora. Primjenjuje se za analizu pepela, vina, hrane, goriva, motornog ulja, biomase itd. Prednosti ove tehnike su mala količina uzorka, visoka preciznost, selektivnost te niske granice detekcije [19,25].

2.5.7. Atomska apsorpcijska spektrometrija

Atomska apsorpcijska spektrometrija je vrsta atomske spektrometrije kojom se može odrediti ukupna živa u čvrstim i tekućim uzorcima. Mogu se analizirati uzorci koji su prošli ili nisu prošli predtretman. Rad analizatora AMA 254 Mercury Analyzer korištenog u ovom radu može se podijeliti u tri dijela : raspad, sakupljanje i detekcija.
Analizator žive se primjenjuje za analizu ugljena, ostataka razgradnje, tla, biomase, ribe itd [26].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 . Određivanje sadržaja ekstraktivnih tvari

Sadržaj ekstraktanta u uzorku *Miscanthusa x giganteus* određivan je ekstrakcijom s otapalom na čvrstoj fazi korištenjem uređaja za ekstrakciju Soxtec System HT2. Uzorak *Miscantheusa x giganteusa* koji se koristi kao kruto biogorivo je samljeven, homogeniziran i osušen do konstantne mase. Izračunata količina suhe tvari u uzorku je 72,8 %, sadržaj vlage u uzorku je 24,2 %.

Reagensi:

- φ (Etanol) = 96%
- Benzen (Benzol), čistoće za spektrometriju, proizvođač Merck

Oprema i pribor:

- Analitička vaga
- Soxtec System HT2 (servisna jedinica, jedinica za ekstrakciju)
- Celulozni tuljci za ekstrakciju 26x60 mm
- Stakleni lončići za ekstrakciju
- Kliješta za rukovanje ekstrakcijskim lončićima
- Eksikator za hlađenje i čuvanje uzorka
- Vata za zatvaranje tuljka s uzorkom
- Metalne žlice i špatule
- Sušionik
- 2 menzure od 50 ml

Uvjeti rada:
Otapalo: 70 ml smjese otapala etanol : benzen u omjeru 1:1
Vrenje : 103 ˚C, 30 min
Ispiranje: 60 minuta
Sušenje: 20 minuta

Određivanje ekstraktivne tvari provedeno je u uzorku i slijepoj probi. Uzorak je stavljen u celulozni tuljac veličine 26x60 mm i pokriven vatom namočenom u otapalu. Za ekstrakciju je korišteno 70 ml smjese otpala etanol-benzen (1:1) ulivene u lončiće za ekstrakciju.
Nakon ekstrakcije lončići su osušeni na temperaturi od 80 ˚C do konstantne mase, ohlađeni u eksikatoru i vagani do konstantne mase.

3.1.1. Određivanje sadržaja celuloze

Reagensi :

- φ (Etanol) = 96%
- φ (HNO_3) = 65 %
- Ultračista voda

Oprema i pribor:

- Analitička vaga
- Sušionik
- Lijevak za filtraciju
- Okrugla tikvica za vrenje 1 l
- Menzure volumena 10, 25 i 250 ml
- Pinceta
- Lijevak za filtraciju sa sinterom (G4)
- Uređaj Rotavapor SB-1200 Cole Parmer s vodenom kupelji

1 g uzorka odvagano je u tikvicu, na što je je dodano 250 ml smjese HNO_3 φ = 65 % i etanola φ = 96 % u omjeru 1:4. Tikvica je stavljena na rotavapor (bez vakuma), te je kuhana na vodenoj kupelji 60 minuta uz povratno hladilo. Tekućina je oddekantirana u prethodno odvagani lijevak za filtraciju (G4), nakon čega je ponovno u tikvicu dodano 25 ml smjese otapala HNO_3 φ = 65 % i etanola φ = 96 % u omjeru 1:4, te kuhano još 60 minuta. Postupak je ponavljan sve dok nije dobiven u potpunosti bijeli ostatak u tikvici. Zatim je vrućom destiliranom vodom ispirano do neutralne reakcije. Lijevak za filtraciju sa sinterom osušen je u sušioniku na temperaturi od 105 ˚C do konstantne mase.

Maseni udio celuloze (w) izračunat je prema izrazu:

$$w \text{ (celuloze)} = \left(\frac{(m2-m1)}{m3}\right) * 100$$

m_1 - masa praznog filter lončića (g)
m_2- masa filter lončića sa celulozom (g)
m_3 - masa apsolutno suhog uzorka (g)

3.1.2.Određivanje sadržaja lignina

Reagensi:

- φ (H_2SO_4) = 72 %
- Ultračista voda

Oprema i pribor:

- Analitička vaga
- Sušionik
- Lijevak za filtraciju sa sinterom (G4)
- Vodena kupelj
- Laboratorijska čaša 1000 ml
- Vakuum sa tikvicom za filtriranje
- Menzure volumena 10, 25, 250 ml
- Pinceta
- Satno staklo

1 g uzorka je odvagan u čašu od 800 ml, dodano je 15 ml 72 % H_2SO_4 i stavljeno da stoji 2,5 sata uz povremeno miješanje staklenim štapićem na sobnoj temperaturi. Nakon dodatka kiseline uzorak je pocrnio. Nakon 2,5 sata dodano je 560 ml destilirane vode i kuhano na vodenoj kupelji 4 sata pokriveno satnim stakalcem. Vrući sadržaj iz čaše u potpunosti je profiltriran kroz prethodno odvagani lijevak za filtraciju sa sinterom, zatim je ispiran destiliranom vodom do neutralne reakcije. Lončići su osušeni na temperuri od 105 ˚C do konstantne mase, te su vagani do konstantne mase.

Maseni udio lignina (w) izračunat je prema izrazu:

$$w \text{ (lignina)} = \left(\frac{(m2-m1)}{m3}\right) * 100$$

m_1 - masa praznog filter lončića (g)
m_2 - masa filter lončića sa celulozom (g)
m_3 - masa apsolutno suhog uzorka (g)

3.2. Ionska kromatografija

Ionska kromatografija je provedena na instrumentu Dionex IC 3000.

3.2.1. Određivanje kationa ionskom kromatografijom

Donja granica primjenjivosti metode, granica kvantifikacije:

- γ (Na^+) = 0,033 mg/l
- γ (K^+) = 0,083 mg/l

Gornja granica nije određena jer se uzorci koji izlaze izvan područja kalibracije mogu razrjeđivanjem dovesti u područje kalibracije.

Radni uvjeti za katione:
- kolona : CS16 Analitycal 4 x 250 mm
- protok : 1,0 ml/min
- koncentracija pokretne faze (MSA) : 25 mmol/dm^3
- struja na supresoru : 79 mA
- temperatura kolone : 30 ˚C

Reagensi:

- Kalibracijski standard - smjesa 6 kationa (Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}), Dionex Corporation, Sunnyvale, California, SAD
- Voda za ionsku kromatografiju - električna vodljivost < 0.1 µS/cm

Oprema i pribor:

- Analitička vaga
- Odmjerna tikvica od 100 ml
- Fluoropolna posuda
- Laboratorijska peć

- Ionski kromatograf ICS 3000, proizvođač Dionex Corporation SAD
- 5 ml viale i čepovi
- Celulozni filteri, 0,45 μm

Vodena otopina *Miscanthusa* i slijepa proba zagrijavane su u pećnici na temperaturi od 120 ˚C, 1 sat. Uzorak je profiltriran na filtrima od celuloze veličine pora 0,45 μm i analiziran. Separacija Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+} i Ca^{2+} prisutnih u uzorku ionskom kromatografijom napravljena je korištenjem separacijske kolone punjene kationskim izmjenjivačem uz vodenu otopinu metansulfonske kiseline MSA (Dionex) kao mobilnu fazu. Koncentracija odgovarajućeg kationa određena je kalibracijskom metodom vanjskog standarda.

3.2.2. Određivanje aniona ionskom kromatografijom

Donja granica primjenjivosti metode, granica kvantifikacije za klorid:

- γ (Cl^-) = 0,020 mg/l

Radni uvjeti za anione:
- kolona : AS15 Analytical 4 x 250 mm
- protok : 1,0 ml/min
- koncentracija pokretne faze (KOH) : 28 mmol/dm^3
- struja na supresoru : 75 mA
- temperatura kolone : 30 ˚C

Reagensi :

- Kalibracijski standard - smjesa 7 aniona (F^-, Cl^-, NO^{2-}, NO^{3-}, Br^- , SO_4^{2-}, PO_4^{3-}), Dionex Corporation, Sunnyvale, California, SAD
- Voda za ionsku kromatografiju - električna vodljivost < 0.1 μS/cm

Oprema i pribor:

- Ionski kromatograf ICS 3000, proizvođač Dionex Corporation SAD

- 5 ml viale i čepovi
- Celulozni filteri 0,45 µm

Vodena otopina *Miscanthusa* i slijepa proba zagrijavane su u pećnici na temperaturi od 120 ˚C, 1 sat. Uzorak je profiltriran na filtrima od celuloze veličine pora 0,45 µm i analiziran. Separacija F^-, Cl^-, NO^{2-}, NO^{3-}, Br^- , SO_4^{2-}, PO_4^{3-} napravljena je na kromatografskoj koloni punjenoj anionskim izmjenjivačem uz vodenu otopinu kalij hidroksida (KOH) kao mobilnu fazu kod analize na Dionexu.

3.3. Spektroskopija NMR

Spektroskopija NMR provedena je u otopini i u čvrstom stanju u svrhu identifikacije i strukturne karakterizacije uzoraka. Jednodimenzijski ^1H i dvodimenzijski DOSY (diffusion-ordered spectroscopy) NMR spektri uzoraka u otopini snimljeni su na instrumentu Bruker Ascend 400. Snimljen je i ^{13}C CP/MAS (cros polarization magic angle spinning) NMR spektar uzorka celuloze u čvrstom stanju na spektrometru Bruker Avance 300 koji je opremljen s 4 mm širokopojasnom probom.

Reagensi :

- φ (Toluen) = min. 99,6 %
- φ (Acetonitril) = min. 99,8 %
- φ (Kloroform) = min. 99, 8 %
- φ (Dimetil sulfoksid) = min. 99,9 %
- Destilirana voda

Oprema i pribor:

- Tarionik s tučkom
- Laboratorijske čaše
- Stakleni štapić
- NMR cjevčice promjera 5 mm
- Bruker Ascend 400

Uzorke lignina i celuloze bilo je potrebno usitniti u tarioniku. 5 mg svakog uzorka je izvagano, te je provjeravana topljivost u 500 µL različitih organskih otapala. Korištena otapala su toluen, dimetil sulfoksid (DMSO), acetonitril, kloroform i voda. Uzorak se slabo otapao u svim otapalima, nešto bolje otapanje uočeno je za DMSO. Kako bismo povećali koncentraciju otopine izvagano je 3 mg uzorka i otopljeno u 600 µL DMSO-a. Otopina je korištena za snimanje ^{1}H i DOSY (pulsni slijed uz korekciju za konvekciju) spektara NMR. Uzorci su otopljeni u NMR cjevčicama promjera 5 mm. Kao unutarnji standard korišten je TMS. Spektri su snimani pri temperaturi od 25 ˚C, snimljeno je 16 snimaka, pri spektralnoj širini od 15 ppm (6010 Hz), razlučivanju od 0,18 Hz, dok je broj točaka u vremenskoj domeni bio 65536. Uvijeti snimanja ^{13}C CP/MAS NMR-a su: vrtnja uzorka 10 kHz, broj prolaza 9000 i vrijeme relaksacije 7 s.

3.4. Spektroskopija IR

Spektroskopija IR je korištena za identifikaciju i karakterizaciju struktura dobivenih spojeva čvrstom stanju.
Spektri su snimljeni na instrumentu Bruker Vector 22.

Reagensi:

- KBr

Oprema i pribor:

- Bruker Vector 22
- tarionik s tučkom
- špatula

Uzorci celuloze i lignina su homogenizirani u ahatnom tarioniku s KBr-om. Pripremljena je KBr pastila korištenjem hidrauličke preše (10 tona) za snimanje IR spektara na instrumentu Bruker Vector 22, opremljen He-Ne laserom valne duljine 632,8 nm. Pastila je prenešena u nosač za snimanje IR spektra, te su spektrometrom snimljeni spektri. Snimljeni su spektri IR u području 4000–400 cm^{-1}, uz razlučivanje 4 cm^{-1} i 32 snimke. Snimljena su dva spektra celuloze i tri lignina.

3.5. Mikrovalno razaranje

Da bismo proveli elementnu analizu tehnikom ICP-OES, uzorak je potrebno prethodno mikrovalno razoriti. Metoda se primjenjuje za elementnu analizu Al, Sb, As, B, Ba, Be, Ca, Cr,Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Hg, Mo, Ni, P, K, Se, Ag, S, Na, Sr, Sn, Te, Ti, Tl, V, Zn. Za postupak mikrovalnog razaranja potrebno je optimirati eksperimentalne parametre (temperatura, snaga, vrijeme, izbor reagensa). Učinkovitost razaranja uzoraka ne treba ocjenjivati na temelju izgleda (boje, gustoće), već je potrebno provesti instrumentnu analizu tehnikom ICP-OES. Primjerice bezbojne otopine, koje se vizualno ne razlikuju od vode često sadrže značajnu količinu organskih tvari koje mogu utjecati na mjerenje tehnikom ICP-OES.

Reagensi:

- φ (HNO_3) = 65 %
- φ (H_2O_2) = 30 %

Oprema i pribor:

- ETHOS UP SK-15
- Analitička vaga
- Tikvica od 50 ml
- Plastične i metalne žličice

Uzeta su tri uzorka *Miscanthusa* mase m_1= 0.4992 g, m_2=0.5008 g, m_3=0.5000 g u tri tikvice od 50 ml. Uzorci su preneseni u posude za mikrovalnu digestiju. U svaki od uzoraka dodano je 9 ml HNO_3 i 1 ml H_2O_2 pazeći da ne ostaju ostaci uzorka po stijenkama posude. Uz uzorke paralelno je rađena slijepa proba. Uvjeti rada su podešeni na instrumentu. ϑ_1 je temperatura u unutarnjem dijelu instrumenta, a ϑ_2 u vanjskom.

Tablica 2. Podešeni uvjeti rada mikrovalne digestije

KORAK	VRIJEME/min	ϑ_1 /˚C	ϑ_2/˚C	SNAGA / W
1	00:15:00	200	120	900
2	00:15:00	200	120	900

3.6. Elementna analiza biomase tehnikom ICP-OES

Tehnikom ICP-OES određeni su mikro- i makroelementi koji se nalaze unutar razgrađenog uzorka biomase. Uređaj na kojem su snimani uzorci je Optima 2000 DV proizvođača Perkin Elmer. Analiza je provedena na tri uzorka razgrađene biomase mikrovalnom digestijom. Analizirani su mikro- i makroelementi unutar biomase. Analizirani makroelementi su : Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na, Ti, dok su mikroelementi As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V i Zn.

Oprema i pribor:

- 3x tikvica s uzorkom od 50 ml
- 1 tikvica za slijepu probu od 50 ml
- instrument Optima 2000 DV

Kalibracija za svaki element je provedena metodom vanjskog standarda. Otopine kalibracijskih standarda su prethodno pripremljene otapanjem ishodne otopine multielementnog standarda pri nekoliko koncentracija, snimljeni su odgovarajući spektri te je na temelju intenziteta standarda određena koncentracija metala u uzorku. Uz uzorke snimljena je i slijepa proba.

3.7. Određivanje ukupne koncentracije žive

Ukupna koncentracija žive je određena mjerenjem na AMA254 Mercury Analyzeru proizvođača LECO.

Oprema i pribor:

- 3 * tikvice s uzorkom od 50 ml
- 1 tikvica za slijepu probu od 50 ml
- mikropipeta
- instrument *AMA254 Mercury Analyzer*

Prije određivanja koncentracije žive 100 µl slijepe probe i sva tri uzorka biomase razoreni su postupkom mikrovalno potpomognutog razaranja i pomoću mikropipete unesena u analizator za određivanje ukupne koncentracija žive.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ekstrakcija slijepe probe

Sadržaj ekstraktanta u slijepoj probi određivan je ekstrakcijom s otapalom na čvrstoj fazi pomoću uređaja za ekstrakciju *Soxtec System HT2*. Ekstrakcija je provedena u smjesi otapala (70 ml) etanola i benzena u volumnom omjeru 1:1. Snimljeno je 10 slijepih proba da bismo dokazali preciznost, točnost i ponovljivost korištene metode, te kako bismo odredili granice detekcije i kvantifikacije. Rezultati su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati dobiveni ekstrakcijom slijepe probe

Broj mjerenja slijepih proba:	**Izmjerena vrijednost / g**
1	0,0011
2	0,0006
3	0,0008
4	0,0000
5	0,0004
6	0,0000
7	0,0039
8	0,0000
9	0,0007
10	0,0011
Slijepa proba (g)	**0,0009**
SD	**0,0011**
RSD (%)	**0,13**
IDL (g)	**0,0038**
LOQ (g)	**0,0115**

Rezultati pokazuju prisutnost nečistoća u slijepoj probi koje potječu od korištenog laboratorijskog posuđa, celuloznog tuljca za ekstrakciju ili otapala. Prosjek velikog broja pojedinačnih mjerenja teži prema aritmetičkoj sredini što nam ukazuje na pouzdanost naše metode. Pojedinačne vrijednosti raspoređene su oko graničnog prosjeka uz standardno

odstupanje od 0,0011 g što je prihvatljivo za realne uzorke. Određene su i vrijednosti detekcijskih granica izračunate prema formuli LDL =3,33*SD (SP) i granice kvantifikacije izračunate prema formuli LOQ=10*SD (SP).

4.2. Ekstrakcija uzorka Miscanthusa x giganteusa

Ekstraktanti u biomasi su organski spojevi male ili velike molekulske mase koji uz celulozu i lignin čine kemijsku strukturu biomase.

Prije nego što je proveden postupak ekstrakcije u uzorku biomase određen je udio suhe tvari koji je iznosio 72,8 %, dok je udio vlage u uzorku iznosio 24,2 %.

Ekstrakcija u smjesi otapala (70 ml) etanola i benzena u volumnom omjeru 1:1 provedena je na 6 uzoraka različitih masa. U tablici 4. prikazani su rezultati dobiveni ekstrakcijom.

Tablica 4. Rezultati dobiveni ekstrakcijom uzoraka *Miscanthus x giganteusa*

Broj mjerenja:	Masa uzorka / g	Izmjerena vrijednost mase ekstraktivne tvari / g
1	0,3054	0,050
2	0,3056	0,049
3	3,0050	0,008
4	3,0040	0,005
5	0,1021	0,027
6	0,1015	0,017

Na temelju dobivenih rezultata uočeno je da se s masom uzorka od 0,3 g postiže najbolja učinkovitost ekstrakcije, dok povećavanjem mase uzorka imamo slabiju ekstrakciju i manje mase ekstraktivne tvari. Uzrok tome je najvjerojatnije veća dodirna površina otapala i uzorka unutar celulozna tuljka ukoliko je manja masa uzorka.

Maseni udio (*w*) ekstraktivne tvari izračunat je prema formuli :

w (ekstraktivne tvari) (%) = $\frac{m3-m2}{m1} * 100$

gdje je:
m_1 - masa uzorka u g
m_2 - težina praznog lončića za ekstrakciju u g
m_3 - težina staklenog lončića za ekstrakciju sa suhim ostatkom uzorka u g

Tablica 5. Maseni udijeli ekstraktivne tvari uzorka *Miscanthusa x giganteus*

Broj mjerenja:	Maseni udio ekstraktivne tvari (%)
1	3,63
2	3,60
3	0,57
4	0,36
5	1,96
6	1,28
Ekstraktivna tvar (%)	**1,90**
SD	**1,44**
RSD (%)	**75,94**

Preciznost metode je podudaranje mjernih vrijednosti i iskazana je relativnim standardnim odstupanjem RSD %. Za sve mjerene elemente u biomasi prilikom ponavljanja mjerenja RSD ima vrlo visoke vrijednosti (75,98 %) što ukazuje na loše podudaranje rezultata. Ponovljivost postupka pripreme realnih uzorka je od 2-20 %, a dobiveni rezultati su izvan zadanih kriterija prihvatljivosti, tj. ne nalazi se u intervalu prihvatljivosti. Rezultati nisu ponovljivi, te metoda nije precizna.

4.3. Određivanje sadržaja celuloze i lignina

Nakon kuhanja uzorka, ispiranja smjesom otapala HNO_3 φ = 65 % i 96 % etanola φ = 96 % u omjeru 1:4 i vodom do neutralne reakcije dobiveni su bijeli kristalići celuloze.

Proces je ponovljen da bismo provjerili ponovljivost pripreme uzorka.

Maseni udio celuloze je izračunat prema formuli :

$$w \text{ (celuloze)} = \left(\frac{(m2-m1)}{m3}\right) * 100$$

m_1 - masa praznog filter lončića (g)

m_2 - masa filter lončića sa celulozom

Tablica 6. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja celuloze u uzorku Miscanthusa x giganteusa

Broj mjerenja :	Maseni udio celuloze (%)
1	70,57
2	66,45
Udio celuloze (%)	**68,51**
SD	**2,91**
RSD (%)	**4,25**

Nakon ponovljenog postupka dobivanja celuloze vrijednost relativnog standardnog odstupanja je < 20 % što ukazuje na dobro podudaranje rezultata.

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je ova metoda precizna i pogodna za određivanje celuloze u biomasi.

Prema postupku za određivanje lignina opisanom u eksperimentalnom dijelu (3.1.2), isti postupak je ponovljen zbog provjere ponovljivosti pripreme uzorka.

Maseni udio lignina izračunat je prema formuli:

$$w \text{ (lignina)} = \left(\frac{(m2-m1)}{m3}\right) * 100$$

m_1 - masa praznog filter lončića (g)

m_2 - masa filter lončića sa ligninom (g)

m_3 - masa apsolutno suhog uzorka (g)

U tablici 7. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 7. Rezultati dobiveni određivanjem sadržaja lignina u uzorku *Miscanthusa x giganteusa*

Broj mjerenja	Maseni udio lignina (%)
1	24,22
2	30,46
Udio lignina (%)	**27,34**
SD	**4,41**
RSD (%)	**16,14**

Rezultati su ponovljivi, RSD je unutar intervala prihvatljivosti za ponovljivost pripreme uzorka, te je metoda pogodna za određivanje lignina u biomasi.

U uzorku biomase *Miscanthusa x giganteusa* dobiven je najveći maseni udio celuloze ≈ 69 %, nešto manje lignina ≈ 27 % dok je ekstraktivnih tvari oko 2 %. U tablici 8. prikazan je određeni udio sastojaka biomase.

Tablica 8. Kemijski sastav *Miscanthusa x giganteusa* (% suhe mase)

Udio celuloze (%)	Udio lignina (%)	Udio ekstraktivne tvari (%)
68,51	27,34	1,90

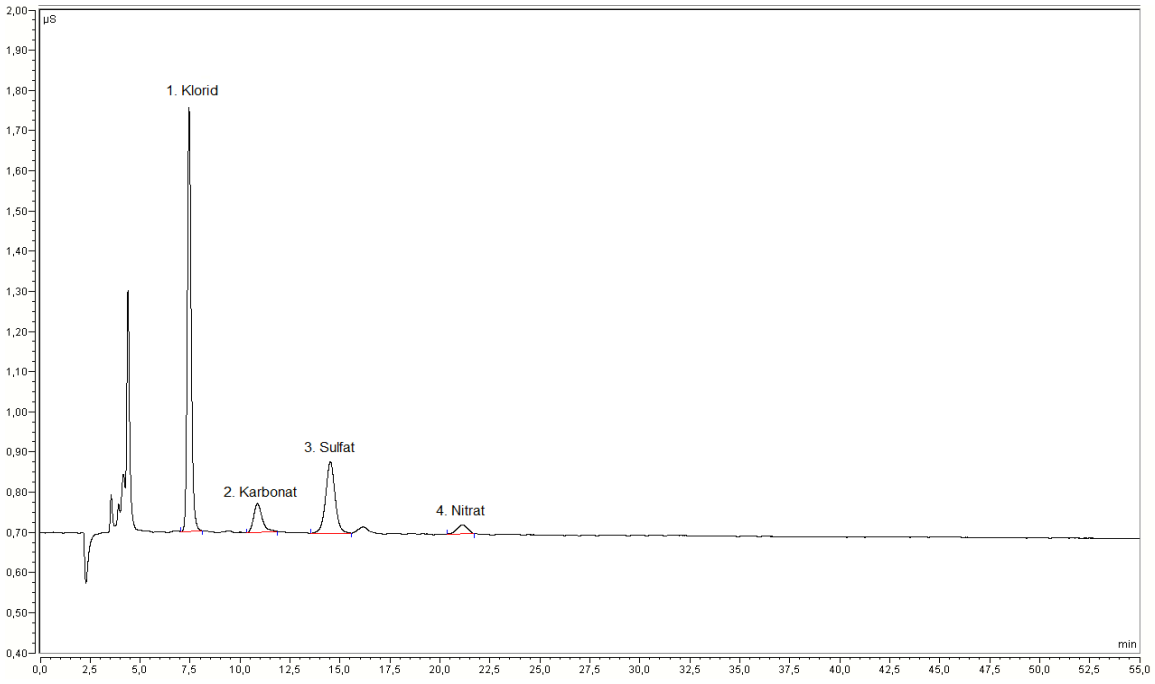
Dobiveni rezultati se poklapaju s rezultatima dobivenim istraživanjima biomase različitih izvora. U usporedbi s dosadašnjim istraživanjima [29] naši rezultati pokazuju značajno veći maseni udio celuloze što upućuje na mogućnost boljeg iskorištenja biomase za proizvodnju bioetanola.

4.4. Ionska kromatografija

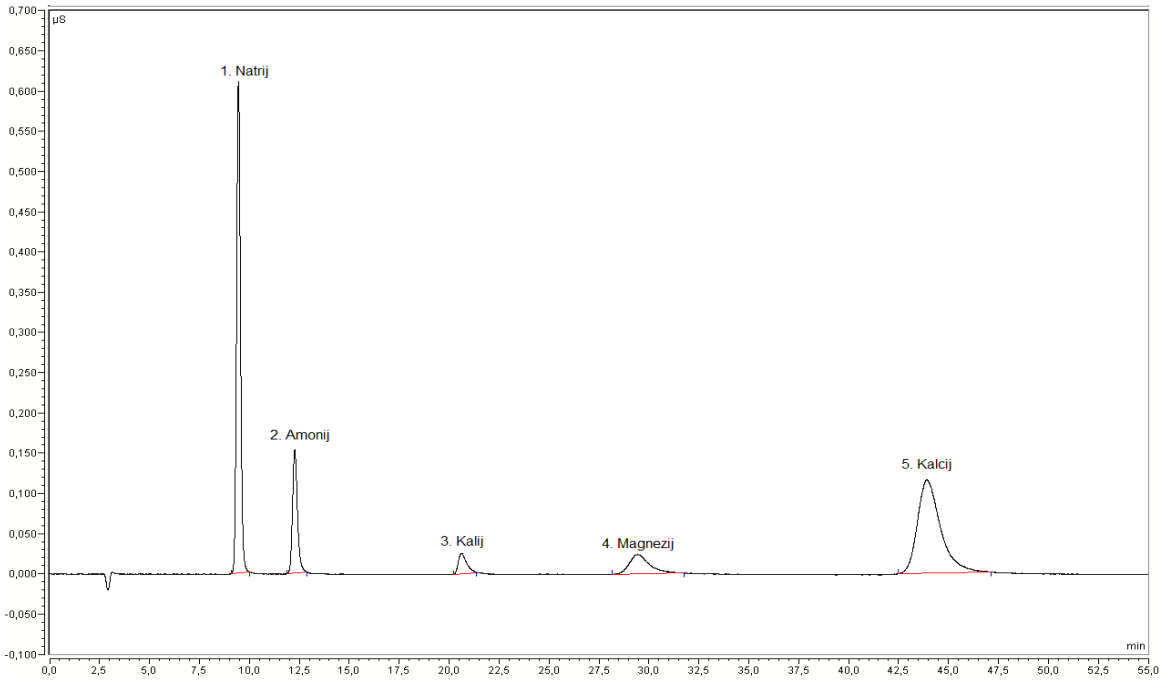
Ionska kromatografija provedena je na instrumentu Dionex IC 3000. Određivane su koncentracije iona K^+, Cl^- i Na^+ koji su neki od sastojaka pepela nastalog izgaranjem biomase. Taljenjem pepela može doći do nastanka taloga i onečišćenja motora [27,28]. Metoda ionske kromatografije omogućava detekciju niskih koncentracija analita u uzorku. Donja granica primjenjivosti metode na instrumentu Dionex IC 3000, granica kvantifikacije za ion Na^+ je 0.033 mg/l, dok je za ion K^+ je 0,083 mg/l. Granica kvantifikacije za ion Cl^- je 0,020 mg/l.

Uzorak slijepe probe koja je u našem slučaju voda električne vodljivost < 0,1 µS/cm, pripremljen je na istovjetan način kao uzorak Miscanthusa, samo bez dodatka analita.

Slijepa proba i vodena otopina Micanthusa odvojene su na ionskim kolonama punjenim kationskim i anionskim izmjenjivačem. Jasno odijeljene frakcije unutar slijepe probe vidljive su iz kromatograma na slikama 12. i 13.



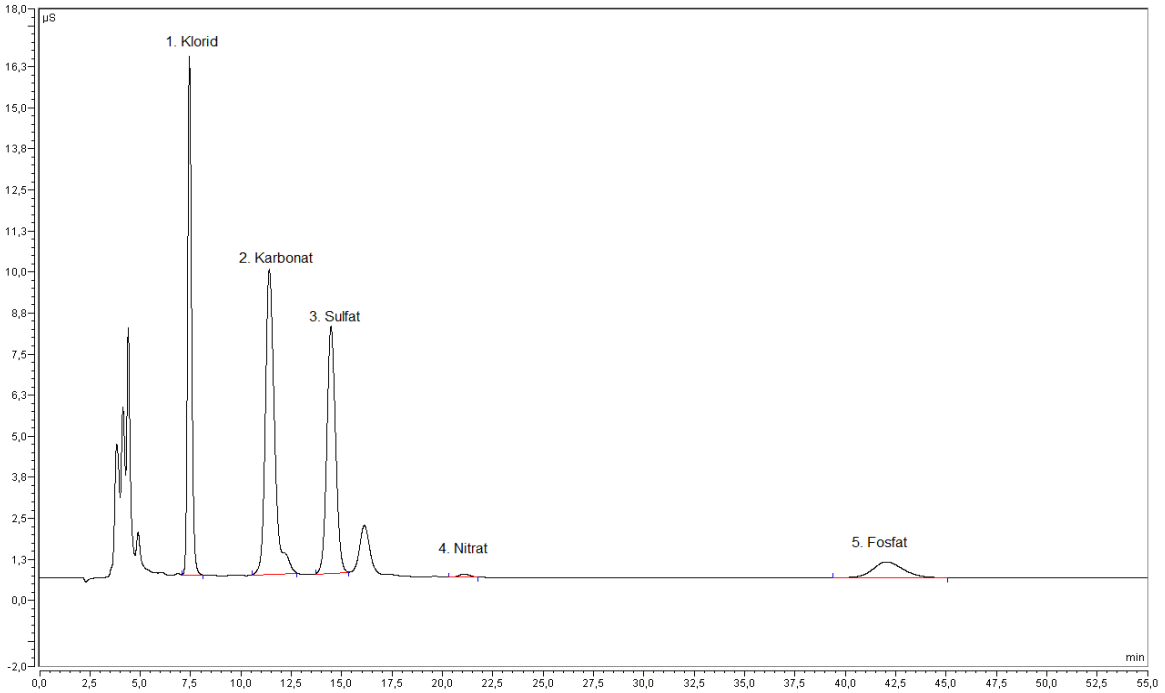
Slika 12. Kromatogram slijepe probe za anione



Slika 13. Kromatogram slijepe probe kationa

Ioni koji su detektirani u slijepoj probi su od korištenog laboratorijskog posuđa. Detektirani su ioni : Cl^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, NO_3^-, Na^+, NH_4^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}.

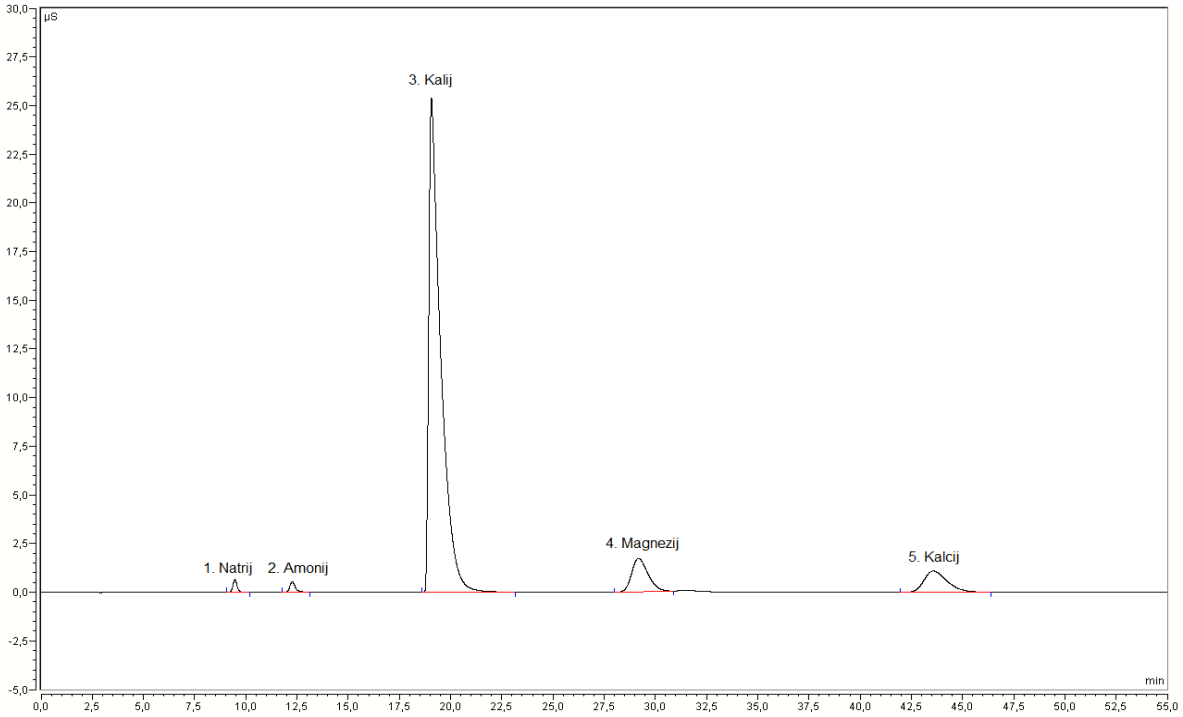
Snimljeni su i kromatogrami vodene otopine *Miscanthusa* za anione i katione. Na slici 14. prikazan je kromatogram vodene otopine *Miscanthusa* za anione.



Slika 14. Kromatogram aniona vodene otopine *Miscanthusa*

U vodenoj otopini *Miscanthusa* pronađeni su ioni Cl^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, NO_3^-, PO_4^{3-} . Uočavamo pojavu iona PO_4^{3-} koji nije prisutan u slijepoj probi. Goriva od biomase sadrže visoku koncentraciju kalija i fosfora koji stvaraju spoj K_3PO_4 koji može stvarati taloge, prah ili aglomerate [27,28].

Na slici 15. prikazan je kromatogram kationa vodene otopine Miscanthusa. Iz kromatograma jasno se uočava prisutnost kalija u visokoj koncentraciji i natrija u niskoj koncentraciji.



Slika 15. Kromatogram kationa vodene otopine *Miscanthusa*

Ioni K^+, Na^+ i Cl^- su detektirani i kvantificirani. Dobivene koncentracije iona su umanjene za iznos slijepe probe kako bi se smanjila pogreška pripreme uzorka. Konačni rezultati su iskazani u mg/kg, a izračunati su prema ispod napisanoj formuli :

$$w(\mathrm{X}) = \frac{(\gamma \mathrm{x} - \gamma \mathrm{xo}) * V}{m}$$

γ_x - koncentracija iona u *Miscanthusu*
γ_{xo} - koncentracija iona u slijepoj probi
V- volumen uzorka
m - masa uzorka

U tablici 9. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 9. Koncentracije iona određene ionskom kromatografijom

Analit	**Slijepa proba** γ (mg/l)	**Vodena otopina *Miscanthusa*** γ (mg/l)	**Masa analita (mg) po kg biomase**
Klorid (Cl^-)	0,56	7,30	674
Natrij (Na^+)	0,26	0,28	2
Kalij (K^+)	0,13	53, 00	5287

U uzorku biomase može se uočiti visoka koncentracija kalija, što može stvarati probleme pri korištenju biogoriva. Kalij sa silicijem može stvarati alkalne silikate koji se tale već pri niskoj temperaturi. Alkalni spojevi mogu reagirat sa sumporom i formirati alkalne sulfate na površini motora. Tijekom hlađenja motora plinoviti kalij može se kondenzirati kao grubi leteći pepeo u obliku KCl ili K_2SO_4. Grubi leteći pepeo ima nisku temperaturu taljenja pa može formirati depozite u motoru formirajući lako taljive ljepljive nakupine na površini motora. Prisutnost Cl^- u metalnim cijevima može uzrokovat stvaranje korozije [27,28]. Koncentracija Na^+ je niska i ne bi trebala utjecati na stvaranje taloga.

4.5. Optička emisijska spektrometrija uz induktivno spregnutu plazmu

Makroelementi prisutni u krutom biogorivu više su zastupljeni u pepelu nastalom izgaranjem goriva nego li u samom gorivu [27,28]. Određivanjem tih elemenata možemo predvidjeti topljivost i mogućnost stvaranja taloga od pepela. Također, visoka koncentracija makroelemenata ukazuje na kontaminaciju goriva s zemljom ili pijeskom. Prema literaturnim podacima očekivani makroelementi prisutni u biomasi su Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na i Ti.

Mikroelementi prisutni u krutom biogorivu mogu biti problem za okoliš, tj. pokazano je da energetski usjevi sadrže veliku koncentraciju kadmija i u onečišćenim područjima druge toksične elemente koji su pronađeni u biogorivima. To može biti problem ako se pepeo nastao sagorjevanjem vrati u šumu kao gnojivo. Pri analizi elemenata u tragovima u biogorivu koji su prisutni u niskim koncentracijama potreban je oprez u pripremi i razaranju uzorka da nebi došlo do kontaminacije uzorka. Važni elementi koji se određuju u biomasi su As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, V i Zn [27,28].

Tehnikom ICP-OES određeni su mikro- i makroelementi u mikrovalno potpomognuto razorenom uzorku biomase. Rezultati su uspoređeni s rezultatima izmjerenim pola godine ranije za uzorke koji su također razoreni pomoću mikrovalova ali je za njihovo razaranje korišten drugačiji volumen reagensa. Rezultati dobiveni u oba mjerenja se poklapaju što ukazuje da promjena uvjeta razaranja ne utječe na konačni rezultat.
U tablicama 10. i 11. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 10. Koncentracije makroelemenata Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na i Ti određenih metodom ICP-OES

Elementi	**Masa analita (mg) po kg biomase**	**Masa analita (mg) po kg biomase (mjerenja iz 11. mjeseca 2015.)**
Al	20,7	20,8
Ca	606, 0	412,8
Fe	20,9	15,7
Mg	432,0	306,0
P	276,0	334,2
K	4978,3	5693,4

Na	40,4	40,9
Si	152,5	160,1
Ti	1,0	0,7
***t* - vrijednost**	**0,6**	

Tablica 11. Koncentracije mikroelemenata As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Hg, Mo, Ni, Pb, Sb, V i Zn određenih metodom ICP-OES

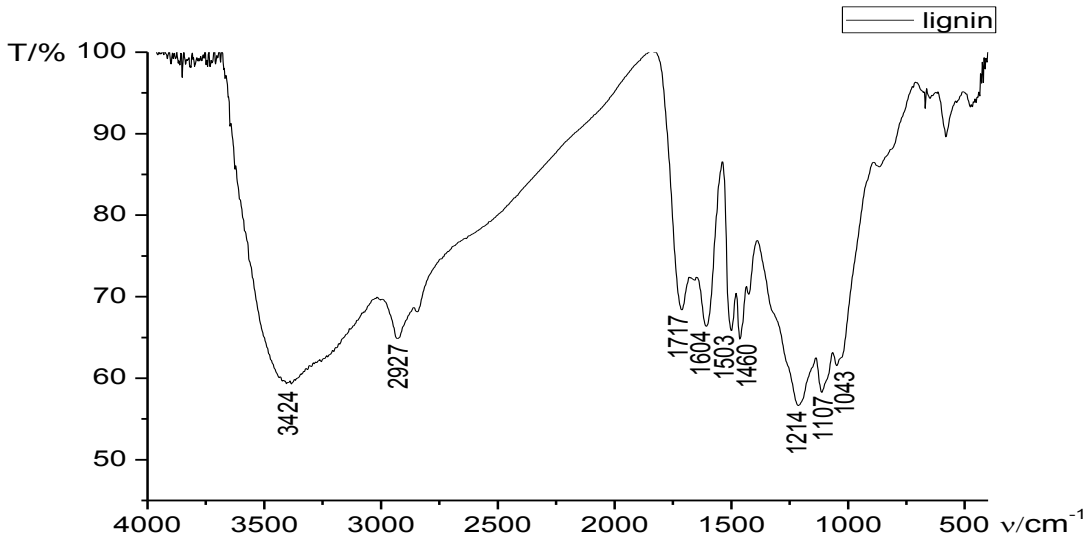
Elementi	**Masa analita (mg) po kg biomase**	**Masa analita (mg) po kg biomase (mjerenja iz 11. mjeseca 2015.)**
Cd	<1	0,13
Mn	155,3	168,9
Zn	20,2	16,3
Cu	48,6	2,0
Mo	<0,010	1,6
Cr	1,45	0,3
V	/	<0,01
Pb	0,5	<0,020
Ni	/	<0,015
Hg	<0,0005	0,021

Za Cd, Mo, V , Ni i Hg nije moguće dobivenu vrijednost preračunati u mg/kg jer je sadržaj metala ispod granice kvantifikacije.

Na temelju Studentovog (*t*) testa iz vrijednosti *t* uz razinu značajnosti 0,6 uočeno je da nema signifikantnih razlika u dobivenim rezultatima za koncentracije uzoraka *Miscanthus x giganteusa* mjerenih nakon mikrovalne razgradnje uzorka. Rezultati se statistički ne razlikuju što ukazuje na to da različita koncentracija reagensa korištena za mikrovalnu razgradnju nema značajnog utjecaja na dobivene rezultate.

4.6. Analiza rezultata spektroskopije IR

Spektroskopija IR služi za identifikaciju i karakterizaciju kemijskih tvari. Spektri IR lignina i celuloze su snimani u srednjem infracrvenom području (4000–400 cm^{-1}) na instrumentu Bruker Vector 22. Na slici 16. prikazan je spektar IR lignina.



Slika 16. Spektar IR lignina

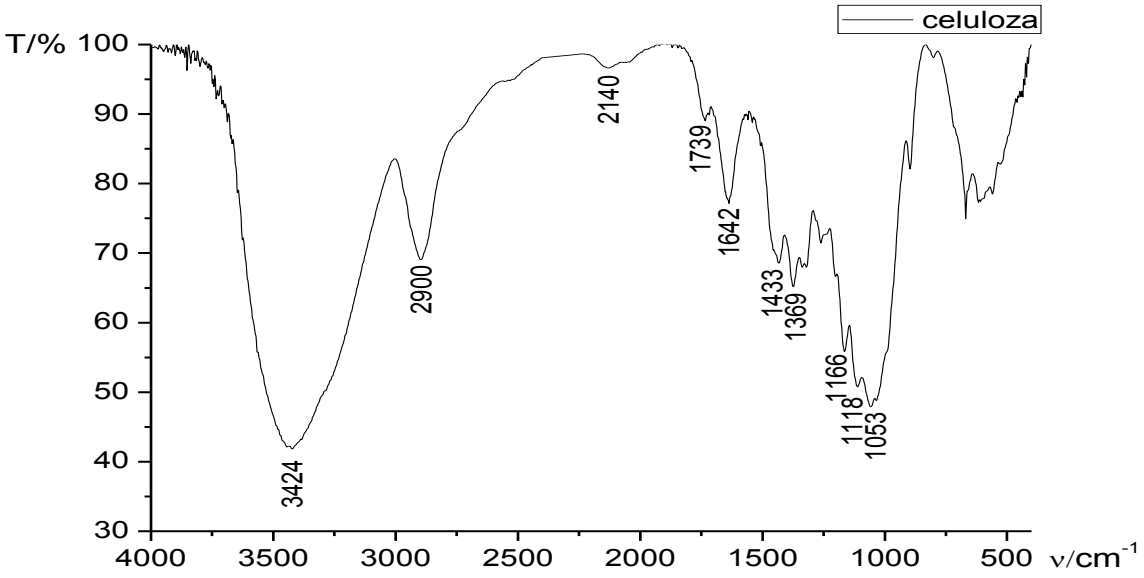
Asignacija spektara je napravljena uz pomoć tablice za asignaciju IR spektara [33], te je uspoređena sa onom iz literature [34, 35, 36].

Asignirano je 9 asimetričnih apsorpcijskih vrpci. U tablici 12. prikazana je asignacija vibracijskih frekvencija. Pri 3424 cm^{-1} nalazi se široka intenzivna vrpca koja pripada istezanju alkoholne ili fenolne O−H veze. Pri 2927 cm^{-1} nalazi se vrpca koja pripada asimetričnom istezanju $O-CH_3$ skupine. U području od 2800 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} nema vrpci. Pri 1717 cm^{-1} se nalazi vrpca koja pripada istezanju C=O veze, odnosno keto skupine na β-položaju fenilpropana.

Vrpce pri 1604 cm^{-1} i 1503 cm^{-1} pripadaju vibracijama aromatskog prstena. Vrpca pri 1460 cm^{-1} pripada deformaciji skupine CH_2. Vrpce pri 1214 cm^{-1}, 1107 cm^{-1} i pri 1043 cm^{-1} pripadaju istezanju C−O veze u alifatskim alkoholima ili fenolima.

Rezultati su uspoređeni s rezultatima dobivenim istraživanjima lignina iz drugih biljaka [34, 35, 36], te uočavamo podudaranje rezultata.

Na slici 17. prikazan je spektar IR celuloze.



Slika 17. Spektar IR celuloze

U spektru celuloze asignirano je 10 karakterističnih vrpci. Asignacija je kao i za lignin napravljena na temelju tablica za asignaciju IR spektara [33], te uspoređena sa asignacijom iz literature [37, 38, 39]. Intenzivna vrpca pri 3424 cm^{-1} pripada istezanju O−H veze, odnosno vodikovih veza. Vrpca pri 2900 cm^{-1} potječe od asimetričnog istezanja C-H (CH_2) veze u metilenskim skupinama. Vrpca pri 2140 cm^{-1} pripada nečistoćama. Pri 1739 cm^{-1} nalazi se vrpca istezanja C=O veze odnosno karboksilne skupine koja potječe od zaostale hemiceluloze u uzorku. Hemiceluloza se uklanja alkalnim tretmanima. Vrpca pri 1642 cm^{-1} pripada istezanju O−H skupine zaostale od vode ili vlage. Pri 1433 cm^{-1} nalazi se vrpca deformacije H−C−H i O−C−H veza u ravnini. Vrpca pri 1433 cm^{-1} naziva se još "veza kristaliničnosti" te nam ukazuje na stupanj kristaliničnosti celuloze, što je vrpca intenzivnija to je veća kristaliničnost. Vrpca pri 1369 cm^{-1} pripada deformaciji C−H veze u ravnini, dok vrpce pri 1166, 1118 i 1053 cm^{-1} pripadaju simetričnom istezanju C-O veze, odnosno istezanju β-1-4-glikozidne veze glukopiranozne jedinice celuloze.

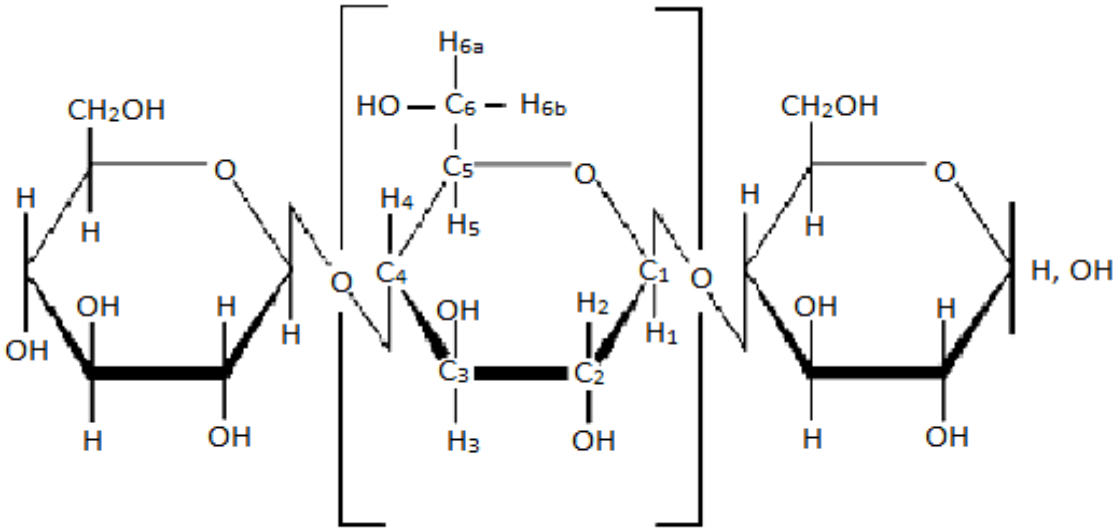
Tablica 12. Asignacija vibracijskih frekvencija lignina i celuloze

Valni broj / cm^{-1} (lignin/celuloza)	**Vibracija**
3424	O–H istezanje
2900	C–H asimetrično istezanje
2927	O–CH_3 istezanje
1739, 1717	C=O istezanje
1604, 1503	Vibracije u aromatskom prstenu
1460	Deformacija strižne vibracije skupine CH_2
1433	Deformacija u ravnini H–C–H i O–C–H
1369	Deformacija u ravnini C–H
1214, 1166, 1118, 1107, 1053, 1043	C–O istezanje

4.7. Analiza rezultata spektroskopije NMR

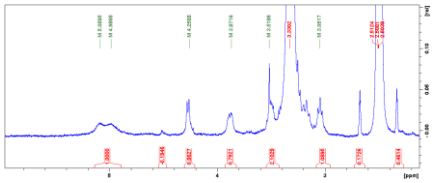
Za strukturnu karakterizaciju celuloze i lignina iz biljke *Miscanthus x giganteus* korištena je i spektroskopija ^{1}H NMR na instrumentu Bruker Ascend 400.

Kemijski neekvivalentni protoni u celulozi mogu se podijeliti u dvije skupine. Kemijski neekvivalenti protoni koji pripadaju CH i C-OH skupinama [42]. Struktura celuloze prikazana je na slici 18.



Slika 18. Struktura celuloze sa prikazanim kemijski neekvivalentnim vodicima [42]

Celuloza je polisaharid kojem se svi protoni nalaze u području od 1,5 do 5,5 ppm. Iz tog razloga teško je provesti asignaciju samo na temelju ^{1}H-NMR spektara. Međutim, moguća je usporedba s literaturnim rezultatima [41, 42]. Osim na temelju kemijskih pomaka broj protona moguće je odrediti i prema intergralu. S obzirom da ^{1}H-NMR ne daje dovoljno podataka, potrebno je snimiti 2D-NMR. U našem slučaju bila je premalena koncentracija za snimanje 2D-NMR, ali dovoljna za snimanje pseudo-dvodimenzijskog DOSY spektra pomoću kojeg se mogu identificirati komponente u smjesi na temelju njihovih difuzijskih koeficijenata. Slika 19. prikazuje spektar ^{1}H-NMR ligina otopljenog u DMSO-d_6. U spektru ^{1}H, signal pri 2,5 ppm pripada otapalu, dok signal pri 3,3 ppm dolazi od prisutnosti vode. U tablici 13. prikazana je asignacija protona.



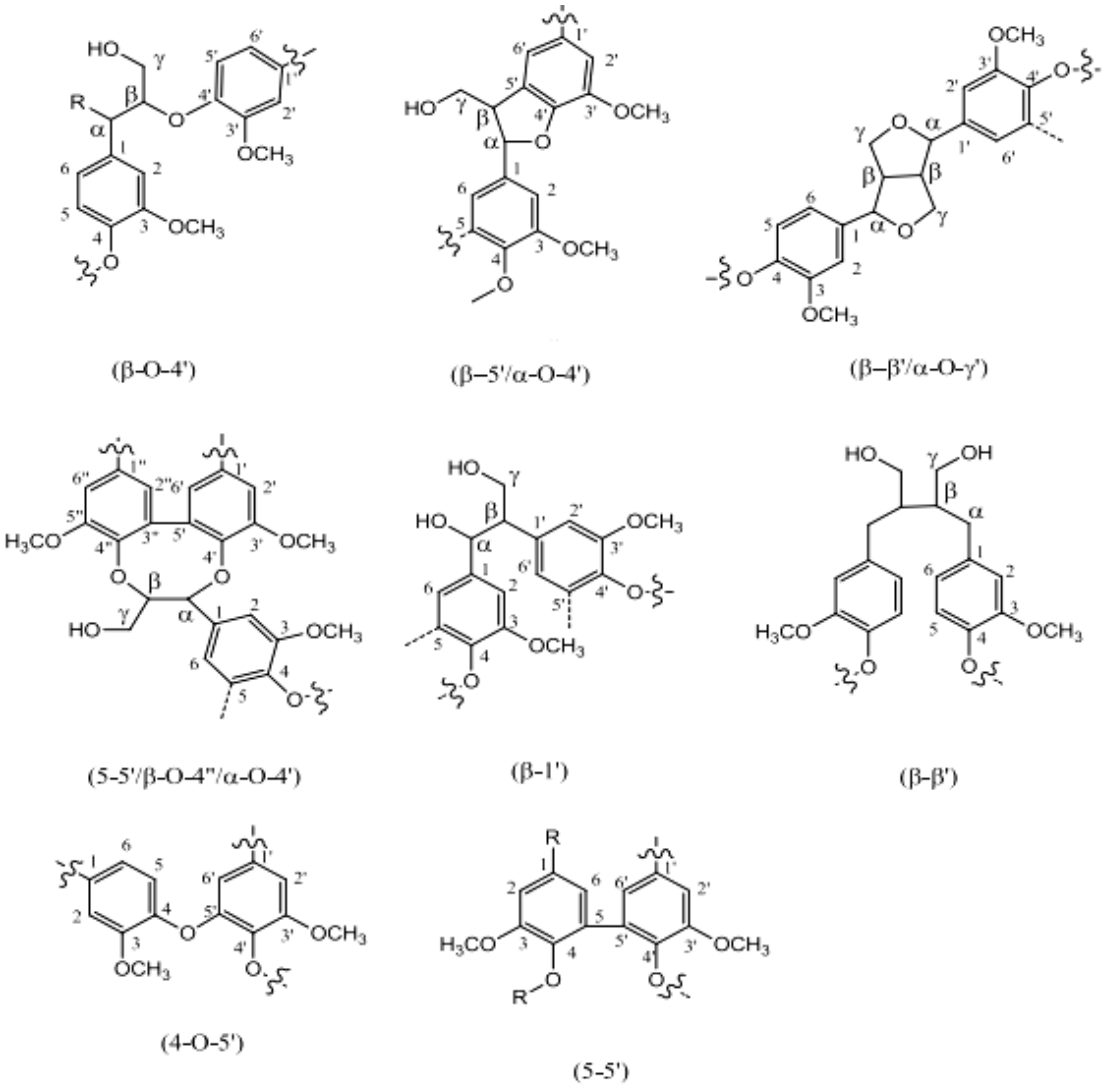
Slika 19. Spektar ^{1}H NMR celuloze u DMSO-d_6

Tablica 13. Predložena asignacija signala u spektru ^{1}H-NMR celuloze

δ / ppm	**Asignacija**
5,08, 5,00	C-OH, H_1
4,26	CH_2, H_{6a}
3,87	CH_2 , H_{6b}
3,52	CH , $H_{3,4,5}$
3,05	H_2

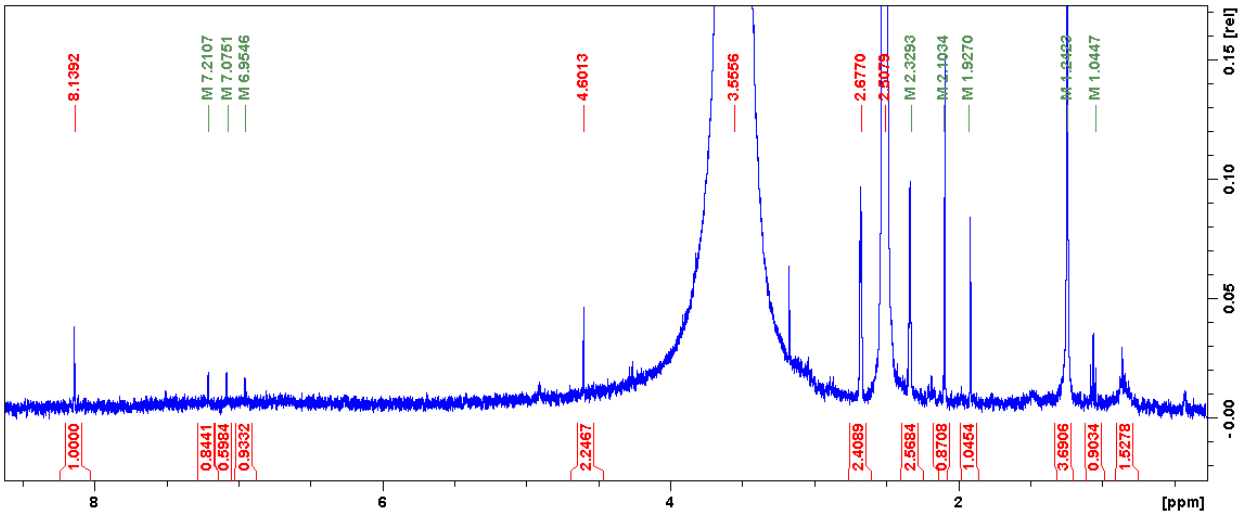
U spektru NMR lignina može se uočiti 11 signala koji odgovaraju kemijski neekvivalentnim protonima.

Mogući strukturni fragmenti lignina prikazani su na slici 20.



Slika 20. Strukturni fragmenti lignina [43]

Signali kemijski neekvivalentnih protona hidroksilnih, aromatskih i metoksilnih skupina se mogu asigniranti u spektrima. Dobiveni rezultati poklapaju se sa rezultatima dosadašnjih istraživanja [43, 44, 45]. Slika 21. prikazuje spektar ^{1}H-NMR ligina otopljenog u DMSO-d_6. Signal pri 2,5 ppm pripada DMSO-u, dok signal pri 3,31 ppm pripada zaostaloj vodi. Ostali signali su asignirani u tablici 14.

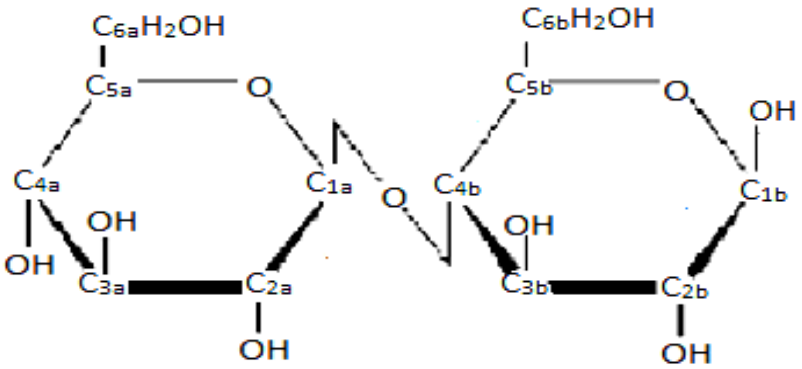


Slika 21. Spektar ^{1}H NMR lignina u DMSO-d_6

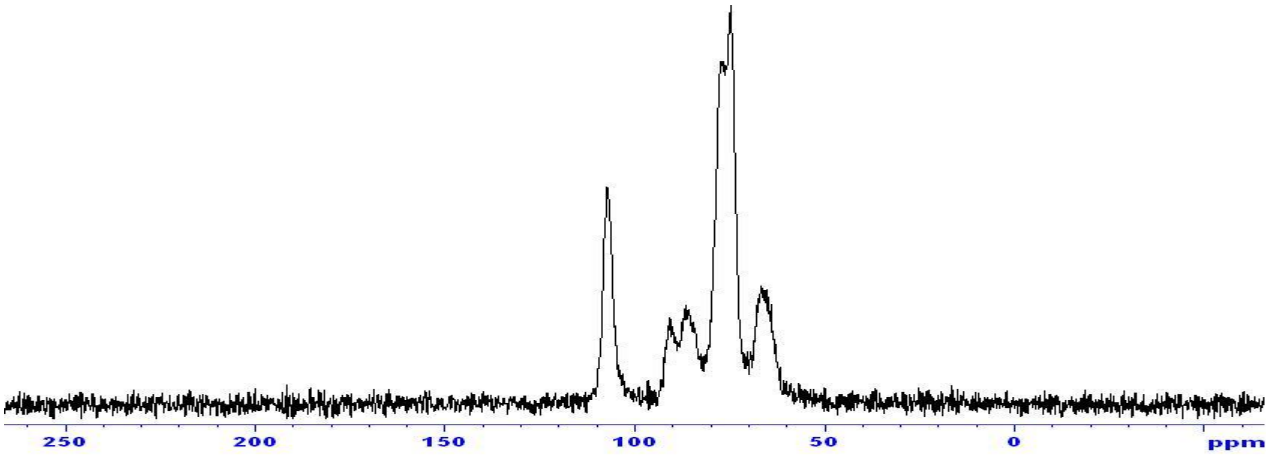
Tablica 14. Predložena asignacija signala ^{1}H-NMR u spektru lignina

δ / ppm	Asignacija
8,14, 7,22, 7,07, 6,96	Aromatski protoni
4, 60	H_β u β-O-4
2,68	H_α u β-β`
2,00, 1,90, 1,29, 0,85	Onečišćenja

Za karakterizaciju celuloze u čvrstom stanju snimljen je i spektar ^{13}C CP/MAS NMR, a asignacija spektra prikazana je u tablici 15. Asignacija spektra u skladu je s onom navedenom u literaturi [46]. Spektar celuloze u čvrstom stanju prikazan je na slici 23.



Slika 22. Strukture celuloze i brojanje atoma



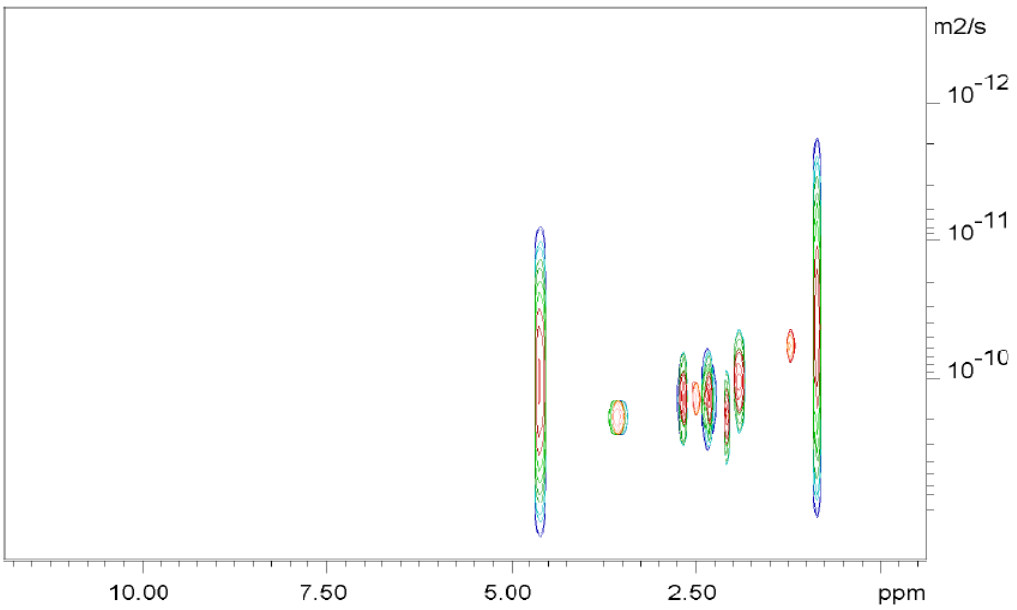
Slika 23. Spektar ^{13}C CP/MAS NMR celuloze

Tablica 15. Predložena asignacija signala ^{13}C CP/MAS NMR spektra celuloze

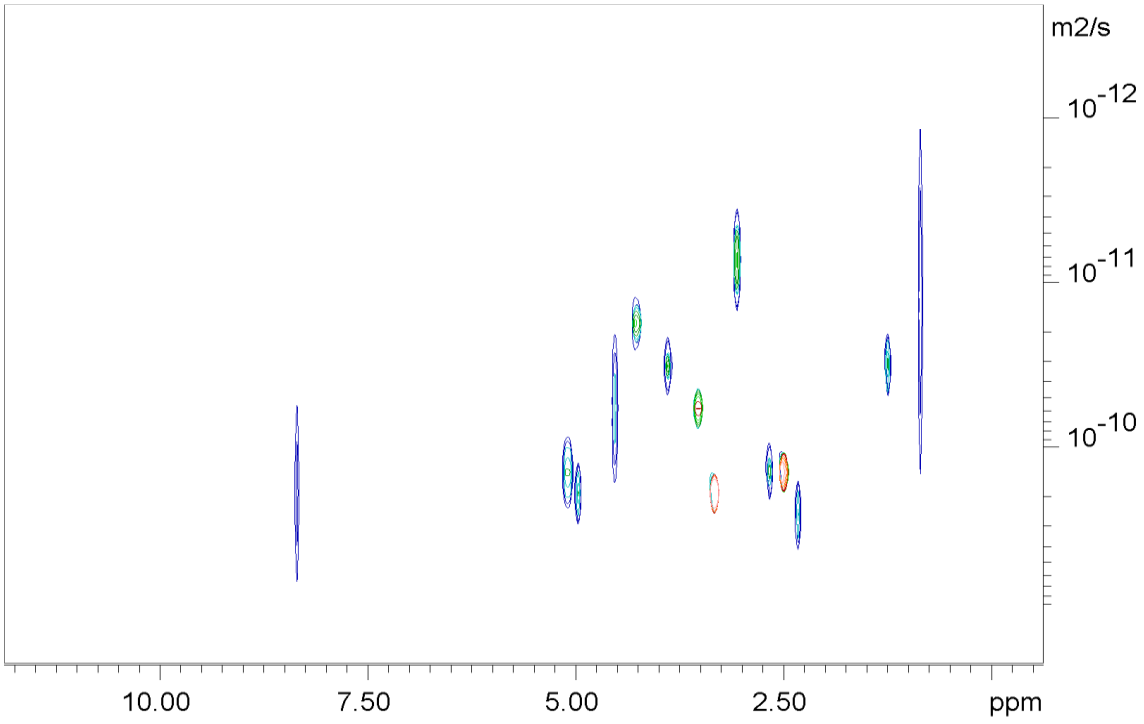
δ / ppm	**Asignacija**
66	C_{1a}, C_{1b}
71-82	C_{4a}, C_{4b}
84-94	C_{2a}, C_{2b}, C_{3a}, C_{3b}, C_{5a}, C_{5b}
110	C_{1a}, C_{1b}

Snimljeni su i pseudo-dvodimenzijski DOSY spektri NMR. Tehnika DOSY se temelji na različitoj translacijskoj difuziji molekula u otopini zbog njihovih različitih masa i fizikalnih svojstva.

Spektri za celulozu i lignin prikazani su na slikama 24. i 25.



Slika 24. DOSY spektar lignina u DMSO-d_6



Slika 25. DOSY spektar celuloze u DMSO-d_6

Na temelju analize DOSY spektara mogu se identificirati različite komponente prisutne u uzorcima lignina i celuloze. Na temelju izračunatih difuzijskih koeficijenata moglo bi se u daljnjim istraživanjima procijeniti veličina i oblik pojedine komponente prisutne u ovim uzorcima.

5. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje je pokazalo da lignocelulozna biomasa *Miscanthus x giganteus*, sadrži oko 70 % celuloze, što je čini pogodnom sirovinom za proizvodnju biogoriva. Rezultati ekstrakcije slijepe probe pokazuju da je metoda ekstrakcije provedena korištenjem smjese otapala etanol : benzen u volumnom omjeru 1 : 1 pouzdana metoda. Standarno odstupanje metode je prihvatljivo te je moguće odrediti granice detekcije i kvantifikacije. Međutim, metoda nije optimalna za određivanje ekstrahtivnih tvari iz biomase i izrazito ovisi o masi. Dobiveno standardno odstupanje je veće od granične vrijednost za realne uzorke što govori u prilog tome da metoda nije dobra u ovom rasponu masa uzoraka. Rezultati mjerenja dobiveni ionskom kromatografijom pokazali su prisutnost Cl^-, K^+ i Na^+ u uzorcima biomase. Određeni udijeli kalija i klora mogu utjecati na stvaranje taloga, praha ili aglomerata odnosno korozije unutar motora, dok izmjerena udio natrija ne bi trebao utjecati na stvaranje onečišćenja. Tehnikom optičke emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu određeni su makro- i mikroelemente prisutni u biomasi. Makroelementi određeni u biomasi bili su: Al, Ca, Fe, Mg, P, K, Si, Na i Ti, dok su mikroelementi bili: As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Hg, Mo, Ni, Pb, Sb, V i Zn. Elemente Cd, Mo, V, Ni i Hg nije moguće kvantificirati, jer je sadržaj metala ispod granice kvantifikacije. Rezultati su uspoređeni s rezultatima dobivenim pola godine ranije. Razlika u dobivenim vrijednostima rezultat je različitog volumena reagensa korištenog pri mikrovalnoj razgradnji uzorka. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da različita koncentracija reagensa za mikrovalnu razgradnju nema značajnog utjecaja na dobivene rezultate. U spektru IR lignina asignirano je 9 apsorpcijskih vrpci karakterističnih za lignin, dok je u spektru IR celuloze asignirano 10 vrpci. Snimljeni su i asignirani ^1H i DOSY spektri NMR celuloze i lignina u DMSO-d_6, te ^{13}C CP/MAS NMR spektar u čvrstom stanju celuloze. Signali prisutni u spektrima odgovaraju onima navedenim u literaturi. Snimljeni DOSY spektri pokazuju prisutnost molekula različitih masa unutar kompleksne smjese lignina i celuloze. Na temelju izračunatih difuzijskih koeficijenata moglo bi se u daljnim istraživanjima procijeniti veličina i oblik komponenti prisutnih u ovakvim uzorcima.

6. LITERATURNA VRELA

1. J. Parlov. Vuković, Primjena spektroskopije NMR u analizi biodizela, *Kem. Ind.* **65** (1-2) (2016) 17−24.

2. M. Stojanović, Uporaba biodizela kao pogonskog goriva u cestovnom prometu, *Pomorski zbornik*, **47-48** (1) (2013) 133-143.

3. Nada V. Babović, Gordana D. Dražić, Ana M. Đorđević, Mogućnosti korištenja biomase poreklom od brzorastuće trske *Miscanthus x giganteus*, *Hem. Ind.* **66** (2) (2012) 223-233.

4. Dž. Bibić, A. Hriberik, I. Filipović, B. Kegl, Utjecaj alternativnih goriva na pokazatelje izgaranja kod dizelovih motora, *Goriva i maziva*, **46** (3) (2007) 206-222.

5. I. Baček, K. Hanaček, I. Kanjir, Karakterizacija gorivih svojstava trave *Miscanthus x giganteus* uzgojene u Republici Hrvatskoj, istraživački rad, Agronomski fakultet, Zagreb, 2012.

6. Z. Mustapić, T. Krička, Z. Stanić, Biodiesel as Alternative Engine Fuel, *Energija*, **55** (2006) 634-657.

7. M. Khanna, B. Dhungana, J. Clifton-Brown, Costs of producing miscanthus and switchgrass for bioenergy in Illinois, *Biomass and bioenergy*, **32** (2008) 482-493.

8. http://zelenihr.hr/wp-content/uploads/2011/11/MISCANTHUS-X-GIGANTEUS-info.pdf (15. 06. 2016)

9. C.V., Beale, S.P. Long, Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus × giganteus* and *Spartina cynosuroides, Biomass Bioenergy,* **12** (6) (1997) 419-428.

10. N. Brosse, A. Dufour, X. Meng, A. Ragauskas, Miscanthus: A fast-growing crop for biofuels and chemicals production, *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, **6** (5) (2012) 580-598.

11. P.F.H. Harmsen, W.J.J. Huijgen, L.M. Bermudez Lopez, R.R.C. Bakker, *Literature Review of Physical Chemical Pretretament Process for Lignocellulosic Biomass*, Food & Biobased research, Biosynergy, Energy research Centre of the Netherland, 2010.

12. V. Janušić, D. Ćurić, T. Krička, N. Voća, A. Matin, Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase, *Poljoprivreda*, **14 (**1) (2008) 53-58.

13. A. Radonić, *Prirodni organski spojevi* (skripta), Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2013.

14. J. R. Dean, *Extraction techniques i Analytical Sciences*, Wiley, New York, 2009.

15. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija* (skripta), Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2015.

16.http://www.crolab.hr/userfiles/file/Najnoviji_trendovi_u_primjeni_ionske_kromatografije.pdf (15.07.2016.)

17. B. Prugovečki, Ž.Soldin, *Instrumentne metode izučavanja tvari u čvrstom stanju* (predavanja), Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2015.

18. B. H. Stuart*, Infrared spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, England, 2004.

19. S. Rončević, *Instrumentna analitika 1* (skripta), Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2014.

20. T. Jednačak, Razvoj metodologije vibracijske spektroskopije *in-line* za praćenje kemijskih reakcija i kristalizacije biološki aktivnih molekula, doktorski rad, Zavod za analitičku kemiju, Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2013.

21. P. Novak, T. Jednaček, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara, Varaždin, 2013

22. R. M.Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Wiley, New York , 1988.

23. A. Dizdar, Mikrovalna i ultrazvučna digestija pepela krutih, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva I tehnologije, Zagreb, 2012.

24. http://www.labcompare.com/Chemical-Analysis-Equipment/24980-Laboratory-Digestion-Systems/?search=digestion (25.08.2016.)

25. D. Amorello, S. Barreca, M. Bruno, A. Pettiganano, Chemical characterization of ancient liturgical vestment (chasuble) by Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP–OES), *Microchemical Journal,* **129** (2016) 305-309.

26. http://www.usbioecuador.com/descargas/AMA254-ht.pdf (28.08.2016.)

27. X.C. Baxter, L.I. Darvell, J.M. Jones, T. Barraclought, N.E. Yates, I. Shield, Study of Miscanthus x giganteus ash composition variation with agronomy and assessment method, *Fuel* **95** (2012) 50-62.

28. X.C. Baxter, L.I. Darvell, J.M. Jones, T. Barraclought, N.E. Yates, I. Shield, Miscanthus combustion properties and variations with Miscanthus agronomy, *Fuel* **117** (2014) 851-869.

29. C. Pokhrel, *Determination of strenght properties of pine and its comparasion with birch and eucalyptus*, Bachelor's Thesis, Saimaa University of Applied Sciences, Technology Imatra, Degree Programme in Chemical Engineering, 2010.

30. https://news.illinois.edu/blog/view/6367/206229 (09.09.2016.)

31. Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresurce Tehnology*, **83** (2002) 1-11

32. G. Yang, P. Jaakkola, *Wood chemistry and isolation of extractives from wood*, Literature

study for BIOTULI project, University of Applied Sciences, Saimaa, 2011.

33. N.Galić, S. Miljanić, *Viši praktikum analitičke kemije* (skripta), Kemijski odsjek, PMF, Zagreb, 2014.

34. I. Bykov, Characterization of Natural and Technical Lignins usig FTIR Spectroscopy, Master thesis, Department of Chemical Engineering and Geosciences, Division od Chemical Technology, Luleå University of Techology, Luleå, 2008.

35. O. Derkacheva, D.Sukhov, Investigation of Lignins by FTIR spectroscopy, *Macromol. Symp*., **265** (2008) 61-68

36. G. Zhou, G. Taylor, A. Polle, FTIR-ATR-based prediction and modelling of lignin and energy content reveals independent intra-specific variation of these traits in bioenergy, *Plant methods*, **7** (2011) 9

37. D. Ciolacu, F. Ciolacu, V.I. Popa, Amorphus cellulose-structure and characterization, C*ellul. Chem. Technol.,* **45** (2011) 13–21

38. C. Parida, S. Kumar Dash, C. Pradhan, FTIR and Raman Studies of Cellulose Fibers of Luffa cylindrica, *Open Journal of Composite Materials*, **5** (2015) 5-10

39. M. Fan, D. Dai, B. Huang, *Fourier Transform - Materials Analysis*, Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres, InTech, 2012.

40.http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja (14.09.2016.)

41. A. Isogai**,** NMR analysis of cellulose dissolved in aqueous NaOH solutions, *Cellulose* **4** (1997) 99–107

42. K. Kuroda, H. Kunimura, Y. Fukaya, H. Ohno, ^{1}H NMR analysis of cellulose dissolved in non-deuterated ionic liquids, *Cellulose* **21** (4) (2014) 2199-2206

43. S. Nakagame, The influence of lignin on the enzimatic hydrolysis of pretreated biomass substrates, doktorski rad, The Univerisy of British Columbia, Vancouver, November, 2010.

44. K. Lundquist, K.Stern, Analysis of lignins by ^{1}H NMR spektroscopy, *Nordic Pulp & Paper Research Journal* **4** (1989) 210-213

45. K. Lundquist, ^{1}H NMR spectral studies of lignins, *Nordic Pulp & Paper Research Journal* **1** (1991) 004-008

46. H.Kono, S.Yunko, T.Shikano, M.Fujiwara, T.Erata and M.Takai, CP/MAS ^{13}C NMR Study of Cellulose and Cellulose Derivatives. 1. Complete Assignment of the CP/MAS ^{13}C NMR Spectrum of the Native Cellulose, *J.Am.Chem.Soc.* **124** (25) (2002) 7506-7511

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 27.1.1993. godine u Zadru. Osnovnu školu "Vladimir Nazor" sam završila u Neviđanima na otoku Pašmanu. Nakon završene osnovne škole upisala sam Opću gimnaziju Biograd u Biogradu na Moru koju sam završila 2011. godine. Te iste godine sam upisala Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu smjer preddiplomski studij Kemije, koji sam završila 2014. godine te dobila zvanje prvostupnika kemije. Završni rad "Kofein" sam napravila pod vodstvom izv. prof. dr. sc Ani Radonić. Diplomski studij kemije sam upisala na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, smjer analitička kemija i biokemija.

Tijekom obrazovanja odradila sam stručnu praksu u Zavodu za javno zdravstvo u Zadru. Pridonijela sam popularizaciji znanosti sudjelovanjem na Europskoj noći istraživača u Splitu, volontiranjem u Znanstvenim čarolijama, projektu Hrvatskog kemijskog društva te sudjelovanjem u otvorenom danu PMF-a. Stipendistica sam općine Pašman od 2011. do 2016. godine.