

# Modifikacija poli(3-hidroksibutirata) smjesom metilnih estera masnih kiselina dobivenih transesterifikacijom otpadnih jestivih ulja

---

**Dragičević, Danijela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:125802>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-22**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**MODIFIKACIJA POLI(3-HIDROKSIBUTIRATA) SMJESOM  
METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA DOBIVENIH  
TRANSESTERIFIKACIJOM OTPADNIH JESTIVIH ULJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**DANIJELA DRAGIĆEVIĆ**

**Matični broj: 314**

**Split, listopad 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**MATERIJALI**

**MODIFIKACIJA POLI(3-HIDROKSIBUTIRATA) SMJESOM  
METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA DOBIVENIH  
TRANSESTERIFIKACIJOM OTPADNIH JESTIVIH ULJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**DANIJELA DRAGIĆEVIĆ**

**Matični broj: 314**

**Split, listopad 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TEHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TEHNOLOGY**  
**MATERIALS**

**MODIFICATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) WITH**  
**MIXTURE OF METHYL ESTERS OF FATTY ACIDS**  
**OBTAINED BY TRANSESTERIFICATION OF WASTE**  
**EDIBLE OILS**

**DIPLOMA THESIS**

**DANIJELA DRAGIĆEVIĆ**

**Parent number: 314**

**Split, October 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Diplomski studij kemijske tehnologije

Smjer: Materijali

Znanstveno područje: Tehničke znanosti

Znanstveno područje: Kemijsko inženjerstvo

Tema rada je prihvaćena 18. ožujka 2022. na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

Mentor: prof. dr. sc. Branka Andričić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Irena Krešić

### MODIFIKACIJA POLI(3-HIDROKSIBUTIRATA) SMJESOM METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA DOBIVENIH TRANSESTERIFIKACIJOM OTPADNIH JESTIVIH ULJA

Danijela Dragičević, 314

**Sažetak:** Smjese metilnih estera masnih kiselina određene su fizikalne značajke: gustoća i kinematička viskoznost, a primjenom GC-MS analize određen je njezin sastav. Modifikacija poli(3-hidroksibutirata) (PHB) je provedena dodatkom različitih udjela smjese metilnih estera masnih kiselina (SME) s ciljem poboljšavanja mehaničkih i toplinskih svojstava PHB-a i njegove šire komercijalne primjene. Uspješno su pripremljeni filmovi mješavina PHB/SME u kloroformu s 10 mas.%, 15 mas.%, 20 mas.%, 25 mas.% i 30 mas.% SME metodom izlivanja filma iz otopine. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom određeni su fazni prijelazi PHB-a u mješavinama. Utvrđeno je da se, dodatkom SME, staklišta PHB-a snižava, a stupanj kristalnosti raste. Primjenom FTIR analize ispitan je utjecaj SME na PHB.

**Ključne riječi:** biorazgradljivi polimeri, poli(3-hidroksibutirat), smjesa metilnih estera masnih kiselina, toplinska svojstva, interakcije u mješavini

**Rad sadrži:** 47 stranica, 30 slika, 5 tablica, 32 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Sanja Perinović Jozić – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Prof. dr.sc. Branka Andričić – mentor

**Datum obrane:** 27. listopada 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## DIPLOMA THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Tehnology**  
**Graduate study of Chemical Tehnology**

**Orientation:** Materials

**Scientific area:** Tehnical Sciences

**Scientific field:** Chemical Engineering

**Thesis subject** was approved on March 18th, 2022 on Faculty Council of Faculty of Chemistry and Tehnology session no. 25.

**Mentor:** PhD Branka Andričić, Full proffesor

**Tehnickal assistance:** PhD Irena Krešić

### **MODIFICATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) WITH MIXTURE OF METHYL ESTERS OF FATTY ACIDS OBTAINED BY TRANSESTERIFICATION OF WASTE EDIBLE OILS**

**Danijela Dragičević, 314**

**Abstract:** The physical characteristics of the fatty acid methyl ester mixture were determined: density and kinematic viscosity, and its composition was determined using GC-MS analysis. The modification of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) was carried out by adding different proportions of a mixture of fatty acid methyl esters (FAME) with the aim of improving the mechanical and thermal properties of PHB and its wider commercial application. PHB/FAME films of mixtures were successfully prepared in chloroform with 10 mas.%, 15 mas.%, 20 mas.%, 25 mas.% and 30 mas.% FAME by casting the film from the solution. The phase transitions of PHB in the mixtures were determined using differential scanning calorimetry. It was found that FAME addition lowers the glass transition temperature but increases the melting temperature of PHB. The influence of FAME on PHB was also examined using Fourier transform infrared spectroscopy.

**Keywords:** biodegradable polymers, poly(3-hydroxybutyrate), methyl esters of fatty acids, thermal properties, interactions in mixtures

**Thesis contains:** 47 pages, 30 pictures, 5 tables, 32 references

**Original:** Croatian

#### **Defence Committee:**

1. PhD Sanja Perinović Jozić, Associate Professor – chair person
2. PhD Franko Burčul, Assistant Professor - member
3. PhD Branka Andričić, Full Professor – supervisor

**Defence date:** 27th October 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Tehnology in Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku tehnologiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Branke Andričić, u razdoblju od ožujka do listopada 2022. godine.*



*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Branki Andričić na izdvojenom vremenu, trudu, pomoći te brojnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Sve što jesam i što sam postigla dugujem svojim roditeljima i sestrama. Hvala što ste me pratili tijekom studiranja s velikom ljubavi, razumijevanjem i podrškom te time uvijek bili moj najveći oslonac.*

*Hvala kolegicama, a danas već velikim prijateljicama na svim trenucima veselja, smijeha, bodrenja, pomaganja... („Nevrime i nesrića neće na nas nikada...“)*

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

1. Odrediti fizikalne značajke smjese metilnih estera dobivenih transesterifikacijom otpadnih jestivih ulja (gustoću, kinematičku viskoznost).
2. Primjenom GC-MS analize odrediti sastav smjese metilnih estera (SME).
3. Pripremiti mješavine PHB/SME u obliku filmova otapanjem u kloroformu (90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30).
4. Primjenom DSC-a odrediti fazne prijelaze PHB-a u mješavinama te ispitati utjecaj omekšavala na toplinska svojstva PHB-a.
5. Primjenom FTIR-a odrediti položaj i intenzitet karakterističnih apsorpcijskih vrpca u polimernim mješavinama PHB/SME u odnosu na PHB i SME.

## SAŽETAK

Smjesi metilnih estera masnih kiselina određene su fizikalne značajke: gustoća i kinematička viskoznost, a primjenom GC-MS analize određen je njezin sastav. Modifikacija poli(3-hidroksibutirata) (PHB) je provedena dodatkom različitih udjela smjese metilnih estera masnih kiselina (SME) s ciljem poboljšavanja mehaničkih i toplinskih svojstava PHB-a i njegove šire komercijalne primjene. Uspješno su pripremljeni filmovi mješavina PHB/SME u kloroformu s 10 mas.%, 15 mas.%, 20 mas.%, 25 mas.% i 30 mas.% SME metodom izlivanja filma iz otopine. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom određeni su fazni prijelazi PHB-a u mješavinama. . Utvrđeno je da se, dodatkom SME, staklište PHB-a snižava, a stupanj kristalnosti raste. Primjenom FTIR analize ispitan je utjecaj SME na PHB.

**Ključne riječi:** biorazgradljivi polimeri, poli(3-hidroksibutirat), smjesa metilnih estera masnih kiselina, toplinska svojstva, interakcije u mješavini

## **SUMMARY**

The physical characteristics of the fatty acid methyl ester mixture were determined: density and kinematic viscosity, and its composition was determined using GC-MS analysis. The modification of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) was carried out by adding different proportions of a mixture of fatty acid methyl esters (FAME) with the aim of improving the mechanical and thermal properties of PHB and its wider commercial application. PHB/FAME films of mixtures were successfully prepared in chloroform with 10, 15, 20, 25 and 30 % FAME by casting the film from the solution. The phase transitions of PHB in the mixtures were determined using differential scanning calorimetry. It was found that FAME addition lowers the glass transition temperature but increases the melting temperature of PHB. The influence of FAME on PHB was also examined using Fourier transform infrared spectroscopy.

**Keywords:** biodegradable polymers, poly(3-hydroxybutyrate), methyl esters of fatty acids, thermal properties, interactions in mixtures

# SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO .....	3
1.1. POLIMERI.....	4
1.2. POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT) .....	8
1.2.1. Proizvodnja i svojstva poli(3-hidroksibutirat) .....	8
1.2.2. Primjena poli(3-hidroksibutirata) .....	11
1.2.3. Modifikacija poli(3-hidroksibutirata) .....	12
1.3. OMEKŠAVANJE POLIMERA .....	12
1.3.1. Omekšavanje poli(3-hidroksibutirata) .....	<b>13</b>
1.4. METILNI ESTERI MASNIH KISELINA .....	14
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
2.1. Oprema i reagensi .....	17
2.2. Određivanje gustoće i viskoznosti SME.....	17
2.2.1. Određivanje gustoće .....	17
2.2.2. Određivanje viskoznosti .....	18
2.3. Određivanje sastava SME primjenom GC-MS analize .....	18
2.4. Priprema filmova mješavina PHB/SME .....	18
2.5. Određivanje toplinskih svojstava mješavina DSC analizom .....	21
2.6. Određivanje interakcija u mješavini PHB/SME primjenom FTIR-a.....	23
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
3.1. Određivanje gustoće i viskoznosti smjese metilnih estera.....	26
3.1.1. Određivanje gustoće pomoću odmjerne tikvice.....	26
3.1.2. Određivanje gustoće pomoću areometra.....	26
3.1.3. Određivanje viskoznosti .....	26

3.2.	Analiza SME .....	27
3.3.	Diferencijalna pretražna kalorimetrija .....	30
3.4.	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom-transformacijom.....	36
4.	ZAKLJUČAK.....	42
5.	LITERATURA .....	44

**UVOD**

Polimerni materijali imaju veliku primjenu u odnosu na staklo, drvo ili metal zbog brojnih prednosti kao što su: mala gustoća, dobra kemijska postojanost, dobra otpornost na trošenje, mali faktori trenja, velika rastezna čvrstoća, lako oblikovanje i relativno niska cijena. Koriste se za različite namjene, a neke od njih su graditeljstvo, brodogradnja, elektroindustrija, transport, proizvodi široke potrošnje. Polimerni materijali mogu biti prirodni i sintetski (organski i anorganski). Većina sintetskih organskih materijala odnosno plastika i guma proizvode se iz neobnovljivih izvora (najčešće nafta i prirodni plin). U današnjici, sve veći naglasak stavlja se na održivi razvoj, a on predstavlja učinkovito korištenje materijala i energije, smanjenje nastajanja otpada i/ili ponovnu uporabu i recikliranje materijala. Teži se ka kružnom modelu (engl. *Make - Use - Return*) odnosno da se minimaliziraju emisije tvari i energije u okoliš. Upravo zbog ovih razloga traže se neki novi materijali koji će imati svojstva slična konvencionalnoj plastici, ali da udovoljavaju ekološkim zahtjevima današnjeg društva. Istraživanja su usmjerena prema biorazgradljivim polimerima koji su ekološki prihvatljiviji i koriste se kao ambalaža, za proizvodnju higijenskih proizvoda i proizvoda za kratkotrajnu namjenu, u medicini, farmaciji itd. Biorazgradljivi polimeri se dobivaju iz obnovljivih i neobnovljivih izvora i mogu se razgraditi biološkim procesima kao što su kompostiranje (aerobna razgradnja) koje se odvija uz prisustvo kisika i fermentacija (anaerobna razgradnja) koja se odvija bez prisustva kisika. Jedan od predstavnika biorazgradljivih polimera je poli(3-hidroksibutirat) (PHB) koji pripada skupini poli(hidroksi-alkanoata).

U ovom radu će se sagledati utjecaj omekšavala odnosno smjese metilnih estera masnih kiselina na svojstva PHB-a. PHB ima izraženu krutost odnosno slabija mehanička svojstva koja predstavljaju veliku prepreku kod njegove šire primjene te se pomoću omekšavala žele poboljšati. Cilj je bio pronaći omekšavalo koje je također ekološki prihvatljivo zbog čega sje odabrana smjesa metilnih estera masnih kiselina dobivenih transesterifikacijom otpadnih jestivih ulja.

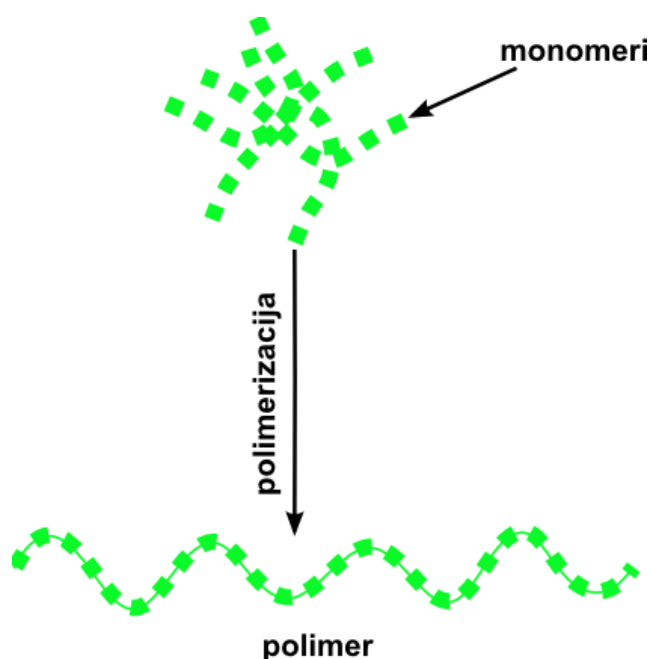


## **1. OPĆI DIO**

## 1.1. POLIMERI

Polimeri su modificirane prirodne i sintetski priređene makromolekule promjera 10 nm - 1000 nm i molekulne mase od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna. Različitim procesima polimerizacije (slika 1) od male molekule – monomera nastaje polimer. Meri predstavljaju ponavljajuće jedinice u makromolekuli povezane kemijskim vezama i čine temeljni lanac.<sup>1</sup> Polimerni materijali se mogu podijeliti:

- s obzirom na porijeklo: prirodni, modificirani prirodni i sintetski (organski i anorganski)
- prema reakcijskom mehanizmu polimerizacije: adicijski (lančani) i kondenzacijski (stupnjeviti)
- prema tipu ponavljajućih jedinica: homopolimeri i kopolimeri
- prema obliku makromolekule: ravnolančani, razgranati i umreženi



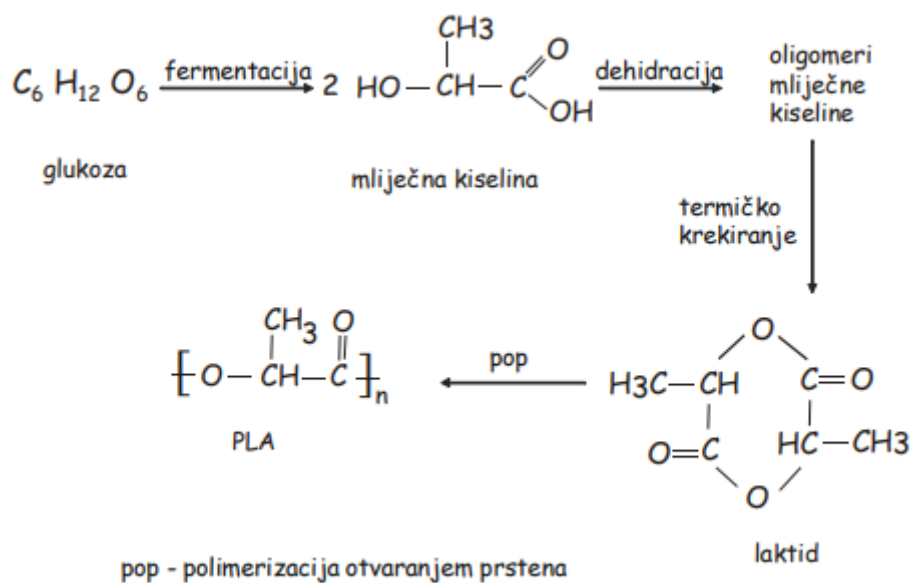
Slika 1. Proces polimerizacije<sup>2</sup>

Prirodni polimeri ili biopolimeri su spojevi velike molekulne mase koji se dobivaju iz obnovljivih izvora. U prirodi se pojavljuju kao segmenti biljnih ili životinjskih tkiva. S obzirom na mere u makromolekuli mogu se klasificirati u nekoliko grupa:

1. Polisaharidi
2. Lignin ili polimerni materijali na bazi koniferil alkohola
3. Bjelančevine (proteini) ili prirodni poliamidi
4. Prirodni kaučuk
5. Prirodne smole

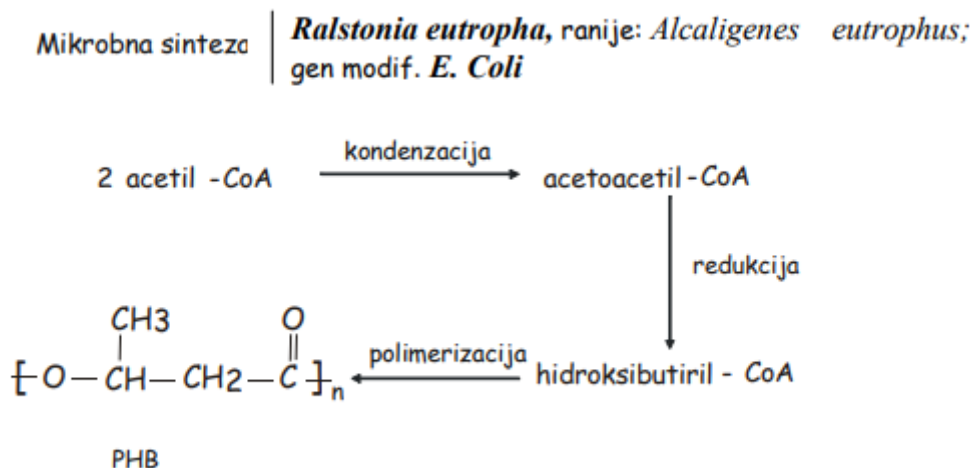
S obzirom na podrijetlo i nastajanje polimera iz obnovljivih izvora razlikuju se još dvije grupe polimera:

1. Polimeri koji nastaju polimerizacijom iz monomera koji potječu iz obnovljivih izvora. Takav polimer je polilaktid ili polilaktidna kiselina (PLA) koji je dobiven iz laktidne kiseline. Laktidna kiselina – monomer, nastaje fermentacijom ugljikohidrata (slika 2).



**Slika 2.** Sinteza polilaktida (PLA)<sup>1</sup>

2. Polimeri nastali u mikroorganizmima ili genetski modificiranim bakterijama (slika 3). Primjer polimera su poli(hidroksi-alkanoati) odnosno poli(hidroksi-butirat) (PHB) i poli(hidroksi-valerat) (PVA) i njihovi kopolimeri.



**Slika 3.** Sinteza poli(3-hidroksibutirata) (PHB)<sup>1</sup>

Polimeri se uglavnom ne koriste u prvobitnom obliku već se modificiraju dodatkom određenih aditiva kao što su punila, omekšavala, pigmenti, stabilizatori kako bi im se poboljšala u cilju dobivanja polimernog materijala koji će se moći koristiti u široj primjeni, tj. u različitim industrijama. Za prirodne polimere bitna je činjenica da su to većinom biorazgradljivi polimeri odnosno polimeri koji se mogu razgraditi djelovanjem mikroorganizama (bakterija, algi, gljivica) u aerobnim uvjetima do ugljikovog(IV) oksida i vode odnosno do ugljikovog(II) i metana u anaerobnim uvjetima. Jedan od biorazgradljivih prirodnih polimera je i poli(3-hidroksi-butirat).<sup>3</sup>

S obzirom na podrijetlo, biorazgradljivi polimeri se mogu podijeliti u četiri temeljne grupe: prirodni polimeri, prirodni modificirani polimeri, monomeri dobiveni fermentacijom te monomeri dobiveni iz petrokemikalija što je prikazano u Tablici 1 Biorazgradljivi polimeri iz neobnovljivih izvora imaju jako dobra svojstva, dobru ponovljivost dok oni dobiveni iz obnovljivih izvora imaju neke nedostatke kao što je mala ponovljivost, lošija svojstva, visoka cijena. Istraživanja vezana za biorazgradljive polimere pretežito su orijentirana na smanjenje njihovih nedostataka.<sup>4</sup>

**Tablica 1.** Podjela biorazgradljivih polimera s obzirom na podrijetlo<sup>5</sup>

<b>PODRIJETLO</b>	<b>PREDSTAVNICI</b>	<b>PREDNOSTI</b>	<b>NEDOSTACI</b>
Prirodni polimeri (biopolimeri)	PHB, celuloza, škrob	Obnovljivi izvori, jeftini	Mala ponovljivost svojstava, mala raznolikost svojstava materijala
Prirodni modificirani polimeri	Škrobni acetat, celulozni acetat	Djelomično obnovljivi izvori	Skupi
Monomeri dobiveni fermentacijom	PLA, poli(butilen fumarat), poli(butilen sukcinat)	Obnovljivi izvori, dobra ponovljivost svojstava	Skupi (osim PLA)
Monomeri dobiveni iz petrokemikalija	Alifatski homopoliesteri, alifatsko-aromatski kopoliesteri	Dobra svojstva materijala, dobra ponovljivost svojstava, jeftini	Neobnovljivi izvori (nafta, plin)

**Biorazgradnja** je razgradnja koju uzrokuje biološka aktivnost (osobito enzimatska) koja dovodi do značajne promjene kemijske strukture.<sup>6</sup>

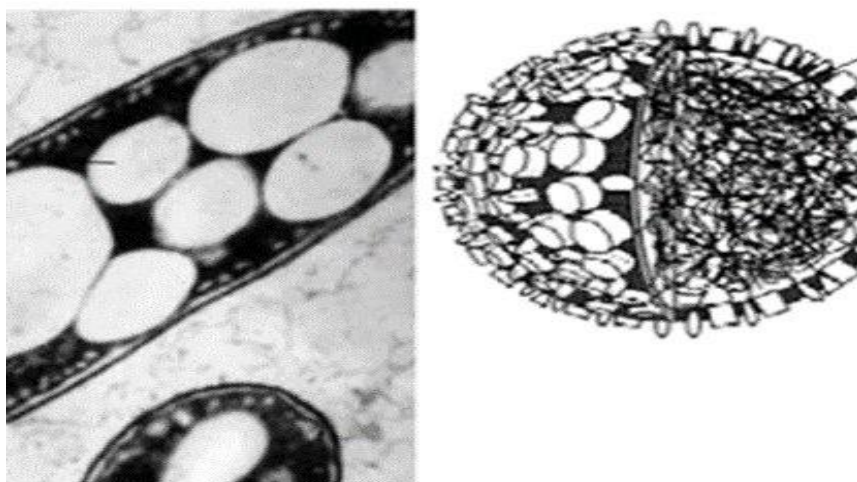
**Biorazgradljiva plastika** je plastika kod koje djelovanjem mikroorganizama dolazi do mijenjanja kemijske strukture.<sup>6</sup>

**Potpuna biorazgradljivost** podrazumijeva razgradnju organskog spoja kao posljedicu djelovanja mikroorganizama uz prisustvo kisika do ugljikovog dioksida, vode, mineralnih soli i biomase ili bez prisustva kisika do ugljikovog monoksida, metana, mineralnih soli i biomase.<sup>7</sup>

## 1.2. POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT)

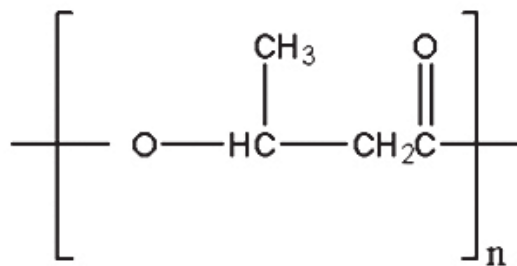
### 1.2.1. Proizvodnja i svojstva poli(3-hidroksibutirat)

Poli(3-hidroksibutirat) (PHB) je biorazgradljivi alifatski poliester koji pripada grupi poli(hidroksi-alkanoata). Poliesteri su spojevi koji u temeljnim makromolekulskim lancima sadrže esterske skupine  $-COO-$ . Čak 75 vrsta različitih mikroorganizama<sup>8</sup> sintetizira PHB s ciljem da posluži kao skladište energije i ugljika unutar stanica. PHB se unutar stanica nalazi u obliku bijelih granula (slika 4). U industriji se dobiva bakterijskom fermentacijom pri čemu se kao izvori ugljika u supstratu upotrebljavaju ugljikohidrati (glukoza i saharoza) iz šećerne trske, repe ili kukuruza. Također, ugljikohidrati mogu biti iz otpada koji nastaje u poljoprivredi ili međuproizvod prehrambene industrije. Za proizvodnju PHB-a najčešće se primjenjuje bakterija *Ralstonia eutropha* jer akumulira znatne količine PHB-a unutar stanice (oko 80 % mase stanice)<sup>9,10</sup>, a i sam mikrobni proces je vrlo jednostavan. Međutim, u posljednje vrijeme počele su se koristiti genetski modificirane bakterije za sintezu PHB-a zbog određenih prednosti s obzirom na nemedificirane bakterije. Nedostatak proizvodnje PHB-a bakterijskom fermentacijom (modificirane i nemedificirane bakterije) je ekonomske prirode. Proizvodnja je dosta skuplja u odnosu na konvencionalnu plastiku, primjerice polipropilen te predstavlja problem široj proizvodnji PHB-a u industrijskom mjerilu. Procjenjuje se da bi cijena PHB-a proizvedenog u genetski modificiranim biljkama mogla biti kompetitivna cijeni konvencionalne plastike.<sup>4</sup>



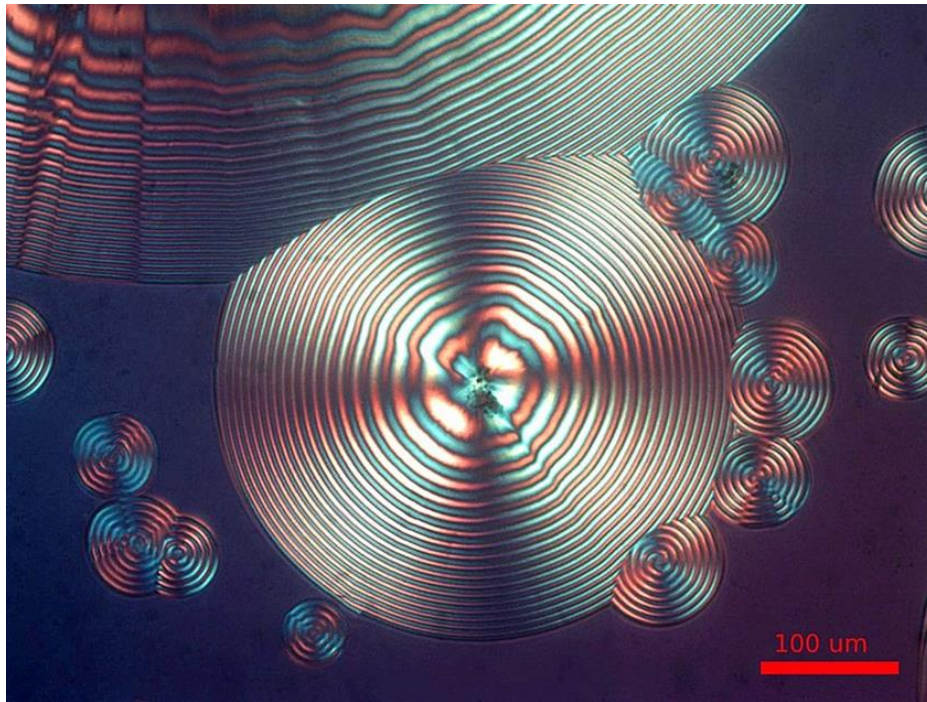
**Slika 4.** Granule PHB-a nakupljene u stanici bakterije *Azobacter chroococcum* (lijevo) i struktura granule PHB-a (desno)<sup>11</sup>

Završna etapa pri dobivanju PHB-a je njegova izolacija iz stanica mikroorganizama. Postoje različite metode izolacije PHB-a<sup>4</sup>, ali se izolacija najčešće vrši metodom ekstrakcije kloroformom zbog dobivanja PHB-a visoke čistoće.<sup>12,13</sup> Međutim, nedostatak je što se proces odvija u više stupnjeva te je samim time potrebna veća količina otapala čime proces biva nepovoljan i ekonomski i ekološki. Kemijska struktura ponavljane jedinice PHB-a je prikazana na slici 5.



**Slika 5.** Kemijska struktura ponavljane jedinice poli(3-hidroksibutirata)<sup>14</sup>

PHB je izotaktni polimer, tj. polimer kod kojeg je ponavljajuća jedinica uvijek u istom konfiguracijskom obliku. Makromolekule su prostorno izvrsno uređene te takva struktura predstavlja osnovni uvjet za lakšu i bržu kristalizaciju. PHB je kristalast polimer sastavljen od kristalnih i amorfni područja, odnosno područja s uređenim lancima i područja sa zapletenim lancima.<sup>13</sup> Ima visok stupanj kristalčnosti (50 % - 75 %). U stanici mikroorganizama je potpuno amorfan dok kristalasta struktura nastaje nakon ekstrakcije iz stanica. Amorfna faza poboljšava elastičnost i preradljivost, a kristalna faza tvrdoću, čvrstoću i gustoću. Kristalizacijom poli(3-hidroksibutirata) iz taljevine nastaju prugasti sferoliti koji su prikazani na slici 6. Sferoliti su kristalna struktura koja je sferno oblikovana te se sastoji od zrakasto usmjerenih lamela. Budući da PHB ima malu brzinu nukleacije, promjer im može biti i do nekoliko milimetara što naglašava njihovu krtoost odnosno slabija mehanička svojstva. Proces kristalizacije ne završava tijekom procesa preradbe, a razlog tome je mala brzina nukleacije te dolazi do sekundarne kristalizacije. Sekundarna kristalizacija je neželjena jer dolazi do stvaranja velikog broja manjih kristala. Kristalizacijom se zapravo želi dobiti manji broj većih kristala.<sup>4</sup>



**Slika 6.** Sferoliti poli(3-hidroksibutirata) promatrani optičkim mikroskopom<sup>15</sup>

Staklište<sup>16-18</sup> PHB-a je između 1 °C i 9 °C, a talište<sup>16-18</sup>  $175 \pm 5$  °C. Maseni prosjek relativnih molekularnih masa je  $2 - 7 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, polidisperznost<sup>16-18</sup> ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ) 1,9 - 2,8, a gustoća<sup>8</sup> iznosi 1,23 g cm<sup>-3</sup>. PHB je plastomer te ne mijenja kemijsku strukturu prilikom zagrijavanja do temperature taljenja, može se oblikovati i nakon hlađenja zadržava oblik. S obzirom na talište, najniža temperatura preradbe treba biti 190 °C s tim da vrijeme prerade može trajati samo nekoliko minuta jer je toplinska razgradnja PHB-a pri toj temperaturi jako brza. Upravo je to prepreka široj komercijalnoj primjeni PHB-a.<sup>4</sup> Prekidna čvrstoća PHB-a iznosi 31 MPa - 35 MPa<sup>16</sup>, a Youngov modul 900 MPa - 2200 MPa<sup>16</sup>. Po ovim svojstvima je sličan izotaktnom polipropilenu (prekidna čvrstoća izotaktnog PP-a iznosi 30 MPa - 38 MPa,<sup>19</sup> a Youngov modul 1032 MPa - 1720 MPa<sup>19</sup>). Međutim, poli(3-hidroksibutirat) je dosta krta i kruta polimer u odnosu na polipropilen što se može vidjeti preko male vrijednosti prekidnog istezanja koja iznosi 3 % - 10 % nasuprot vrijednosti prekidnog istezanja za PP koja iznosi 500 % - 900 %.<sup>20,21</sup> Budući da PHB ima odlična barijerna svojstva prema CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>, može se koristiti kao ambalaža u prehrambenoj industriji. Svojstva prema vodenoj pari su lošija te se trebaju poboljšati. PHB nije topljiv u vodi. Topljivost mu je jako dobra u kloriranim



ugljikovodicima (kloroformu, metilkloridu) te ima slabija barijerna svojstva prema organskim otapalima u odnosu na kovencionalnu plastiku.<sup>4</sup>

### 1.2.2. Primjena poli(3-hidroksibutirata)

Primjena poli(3-hidroksibutirata) potencijalno je široka zbog njegove biorazgradljivosti i neotrovnosti razgradnih produkata. Naime, PHB se najčešće primjenjuje za proizvode jednokratne upotrebe (pelene, britvice), različitu ambalažu (folije, boce, vrećice) te folije za poljoprivredu (slika 7). Također, može se upotrebljavati kao biorazgradljivi nosač za lijekove, insekticide, gnojiva. PHB je pronašao primjenu u medicini gdje se koristi u kirurgiji kao zamjena određenih dijelova kostiju, pričvršćivanje kostiju i zglobova. PHB i proizvodi na temelju PHB-a imaju brojne prednosti, a neke od njih su:

- proizvode se iz obnovljivih izvora
- svojstva su im slična svojstvima polipropilena
- biorazgradljivi su
- razgradljivi su i u ljudskom organizmu, a produkti koji nastaju imaju nisku otrovnost
- mogu se prerađivati istim postupcima kao i proizvodi od konvencionalne plastike<sup>4</sup>.



Slika 7. Moguća primjena poli(3-hidroksibutirata)<sup>22</sup>

### 1.2.3. Modifikacija poli(3-hidroksibutirata)

Postojećom tehnologijom ne može se proizvesti poli(3-hidroksibutirat) koji bi bio kompetitivan konvencionalnoj plastici, a postoje određeni razlozi:

- velika cijena PHB-a u odnosu na konvencionalnu plastiku
- velika krutost i krtost
- toplinska nestabilnost pri temperaturi preradbe zbog čega vrijeme preradbe ne smije biti duže od nekoliko minuta.

Iz tih razloga potrebno je poboljšati njegova svojstva. Tri su načina poboljšavanja svojstava:

1. Biosinteza kopolimera (enzimski katalizirana) – kombinacijom ponavljajućih jedinica i različitih omjera u kopolimeru nastaju kopoliesteri kojim mogu imati različita tališta i kristaličnost, a samim time i poboljšana svojstva
2. Kemijska sinteza uz biosintezu – priprava blok-kopolimera na bazi poli(3-hidroksibutirata). Npr. mogu se sintetizirati poli(ester-uretani) koji imaju dobra toplinska i mehanička svojstva i biorazgradljivi su.
3. Priprava mješavina PHB-a s biorazgradljivim polimerima ili omekšavalima s tim da su mješavine mješljive. Modifikacijom PHB-a mogu se poboljšati njegova mehanička i preradbena svojstva.<sup>4</sup>

### 1.3. OMEKŠAVANJE POLIMERA

U svrhu dobivanja proizvoda optimalnih svojstava polimerima se dodavaju određena omekšavala odnosno plastifikatori. Omekšavala su tvari koje se dodaju da bi se poboljšala savitljivost polimernih izradaka i olakšala preradba. Njihovo funkcioniranje temelji se na principu smanjivanja jakosti međumolekulskih sila između polimernih molekula čime se povećava slobodni volumen što za posljedicu ima povećanje gibljivosti molekula i rastezljivost materijala. Plastifikatori zapravo povećavaju rastezljivost, savitljivost, žilavost, snižavaju Youngov modul, prekidnu čvrstoću, talište, staklište te se zbog toga polimeri mogu koristiti pri nižim temperaturama, poboljšavaju sjaj, provodnost itd. Svojstva idealnog omekšavala bi trebala biti:

1. učinkovitost - omekšavanje polimera u cilju snižavanja staklišta

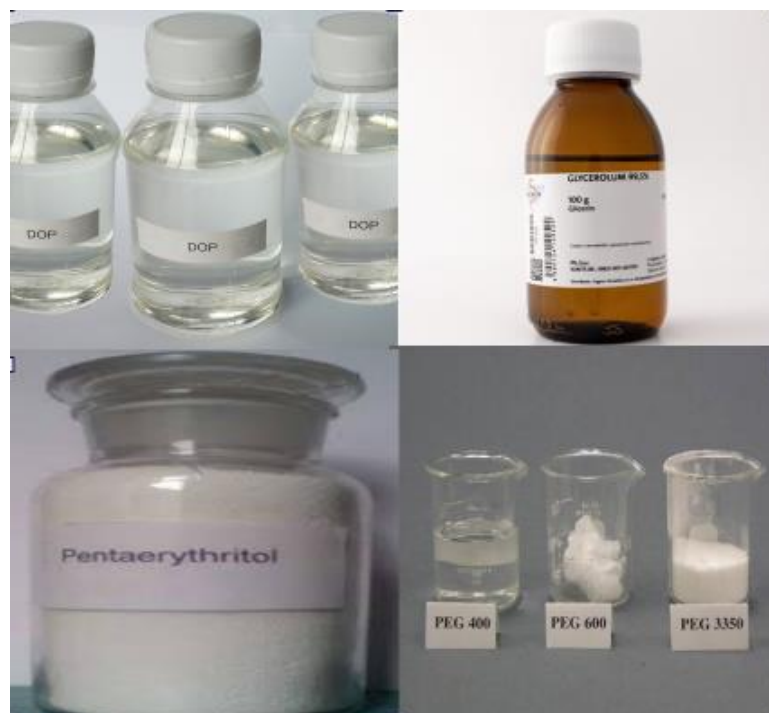
2. postojanost – potpuna kompatibilnost s polimerom, otpornost prema otapalu
3. stabilnost i inertnost – dodatkom omekšavala polimer mora i dalje biti stabilan, omekšavalo se ne smije razgrađivati djelovanjem topline, otapala, ne smije mijenjati boju, ne smije biti otrovno
4. mora dati određena svojstva polimeru: fleksibilnost pri nižim temperaturama, dobru preradljivost
5. omjer cijena/svojstvo mora biti zadovoljavajući.

Općenito, nema idealnog omekšavala koje bi zadovoljavalo u svakom smislu već je potrebno izabrati optimalno rješenje između cijene i željenih svojstava. Omekšavala su zapravo otapala koju nisu hlapljiva te se kompatibilnost s polimerom gleda na osnovu razlike Hildebrandovih parametara topljivosti polimera i otapala koja mora biti manja od  $2,046 \text{ MPa}^{1/2}$  tj.  $(\delta_1 - \delta_2)^2 < 2,046 \text{ MPa}^{1/2}$ .

### **1.3.1. Omekšavanje poli(3-hidroksibutirata)**

Omekšavala koja se koriste za PHB-a su primjerice etilen-glikol, pentaeritrirol, dioktil-ftalat (DOP), dibutil-ftalat (DBP), poliadiopat itd. Međutim, na mehanička svojstva PHB-a najviše utječu poliadiopat, dioktil-ftalat (DOP), glicerol-triacetat (TAG) i kopolimer poli(etilen-oksida) i glicerola ili laprol (LAP). Budući da je PHB biorazgradljiv polimer poželjno je da je omekšavalo također biorazgradljivo i neotrovno kako bi čitavi materijal bio ekološki prihvatljiv. Zato se učinkovita omekšavala kao što su DOP, LAP, poliadiopat ne upotrebljavaju za omekšavanje PHB-a ako se koristi primjerice kao ambalažni materijal.<sup>4</sup> Zbog toga se češće kao omekšavala PHB-a koriste glicerol ili glicerol-triacetat koji ne utječu u velikoj mjeri na toplinska i mehanička svojstva PHB-a. Omekšavalom se snižava talište i staklišta PHB-a. Snižavanje tališta za posljedicu ima smanjivanje temperature preradbe, dok snižavanje staklišta za posljedicu ima smanjenje sekundarne kristalizacije.<sup>4</sup>

Neka omekšavala za PHB prikazana su na slici 8.



**Slika 8.** Omeškavala za poli(3-hidroksibutirat)<sup>23</sup>

#### 1.4. METILNI ESTERI MASNIH KISELINA

Metilni esteri masnih kiselina su skupina organskih spojeva koji se sintetiziraju procesom esterifikacije ili transesterifikacije metanolom. Transesterifikacija je kemijski proces kojim iz biljnih i/ili životinjskih masti i ulja, estera glicerola nastaju esteri odgovarajućih alkohola. Po kemijskom sastavu prirodna biljna i životinjska ulja i masti su triacilgliceroli odnosno esteri dugolančanih masnih kiselina i glicerola.<sup>24</sup> Na slici 9 prikazan je proces transesterifikacije metanolom, pri čemu nastaje smjesa metilnih estera (SME).



**Slika 9.** Prikaz procesa transesterifikacije metanolom<sup>25</sup>

Sirovine za dobivanje SME su biljna ulja (repičino, sojino, palmino, suncokretovo i kukuruzno), životinjske masti (loj, svinjska mast, ulje peradi i ribe) te otpadna ulja i masti.<sup>26</sup> Kod procesa transesterifikacije se koriste katalizatori koji mogu biti homogeni i heterogeni. Homogeni katalizatori su korozivni, ne mogu se ponovno upotrijebiti dok heterogeni katalizatori su manje korozivni, mogu se ponovno upotrijebiti, ali su skupi.<sup>27</sup> Uobičajeni korišteni katalizatori u procesu transesterifikacije su natrijeva i kalijeva lužina (NaOH, KOH) i metoksidi kalija i natrija (CH<sub>3</sub>ONa, CH<sub>3</sub>OK).<sup>24</sup> Reakcijski produkt osim (ne)promijenjenih nečistoća ili primjesa koje su se nalazile u polaznom ulju može uključivati metanol, vodu, katalizator, glicerol, slobodne masne kiseline, sapune, metale i mono-, di- i trigliceride. Aditivi koji se mogu koristiti su antioksidansi, biocidi, sredstva za raspršivanje vode, sredstva protiv pjenjenja itd. Nastale komponente, glicerol i smjesa metilnih estera su međusobno netopljive. Pojedinačni spojevi SME su slabo topljivi u vodi i niske su hlapljivosti. Fizikalna svojstva estera masnih kiselina sličnija su svojstvima fosilnih goriva nego čistih biljnih ulja i svojstva im ovise o vrsti biljnih ulja. Metilni esteri su netoksični i biorazgradljivi. Opća molekulska struktura SME je CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOCH<sub>3</sub> (zasićene masne kiseline) i CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(CH)<sub>x</sub>COOCH<sub>3</sub> (nezasićene masne kiseline).<sup>26</sup>

Metilni esteri se najviše koriste kao alternativno obnovljivo gorivo pod nazivom biodizel. Goriva koja sadrže SME imaju oznaku B nakon kojeg slijedi postotak biodizela u smjesi. B100 je čisti SME koje se može koristiti izravno kao gorivo, ali većinom se miješa s fosilnim dizelom. Najčešće mješavine su s 5 % i 20 % v/v biodizela te imaju oznake B5 i B20. Međutim, zbog svoje kemijske strukture istražuje se djelovanje metilnih estera kao omekšavala za polimere.<sup>26</sup>

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

## 2.1. Oprema i reagensi

Oprema korištena tijekom eksperimentalnog rada:

- Magnetna mješalica
- Vodena kupelj
- Liebigovo hladilo
- Erlenmeyerove tikvice
- Termometar
- Analitička vaga, Mettler Toledo
- Termostatirana kupelj
- Viskozimetar
- Termostat
- Areometar
- Erlenmeyerove tikvice, laboratorijske čašice, Petrijeva zdjelica, pinceta, špatula

Za pripremu filmova PHB/SME upotrijebljen je praškasti PHB, Biomer, Njemačka  $M_v = 385\ 000\ \text{g mol}^{-1}$  (određen viskozimetrijski primjenom jednadžbe  $[\mu] = 1,18 \times M_v^{0,78}$ ), SME sintetizirana tijekom studentskih vježbi na Kemijsko-tehnološkom fakultetu te kloroform kao zajedničko otapalo (BDH Prolabo).

## 2.2. Određivanje gustoće i viskoznosti SME

### 2.2.1. Određivanje gustoće

Smjesi metilnih estera masnih kiselina određene su fizikalne karakteristike: gustoća i viskoznost. Gustoća se mjeri tako što se izvagana odmjerna tikvica od  $10\ \text{cm}^3$  nadopuni do oznake pri  $T=20\ ^\circ\text{C}$ , a zatim masa prazne tikvice se oduzme od mase pune tikvice.<sup>26</sup>

$$\rho = \frac{m}{10}$$

Drugi način mjerenja gustoće je pomoću areometra. U menzuru se ulije tekućina u koju se uroni areometar. Na areometru se nalazi skala na kojoj se očita vrijednost gustoće u  $\text{gcm}^{-3}$ .

### **2.2.2. Određivanje viskoznosti**

Aparatura za određivanje viskoznosti sastoji se od vodene kupelji, termostata i viskozimetra. Viskozimetar se napuni dovoljnom količinom uzorka te postavi u vodenu kupelj temperature 40 °C. Ostavi se da se termostatira 10 minuta. Uzorak se usiše kroz kapilaru viskozimetra do određene oznake i mjeri se vrijeme u kojem tekućina teče do druge oznake. Potrebno je izvršiti 3 mjerenja vremena te se za rezultat uzima srednja vrijednost tih mjerenja. Kinematička viskoznost je umnožak srednje vrijednosti vremena protjecanja i konstante viskozimetra.<sup>28</sup>

### **2.3. Određivanje sastava SME primjenom GC-MS analize**

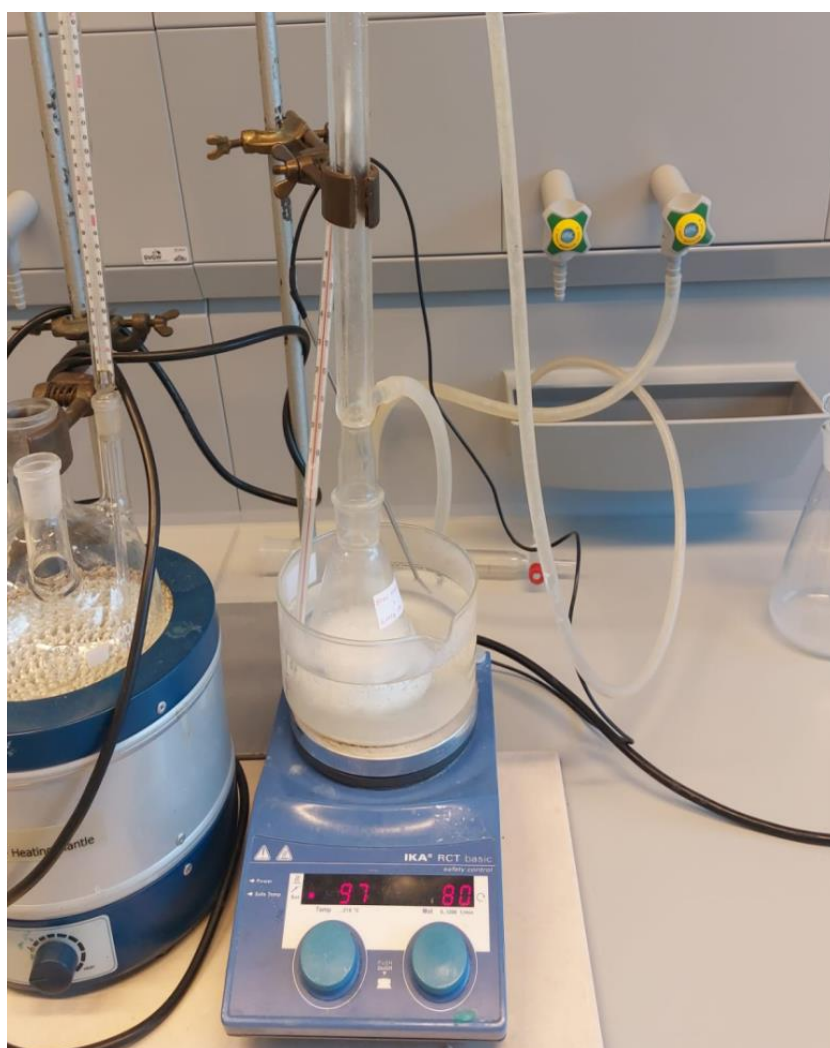
Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu SME korišten je sustav plinske kromatografije. Sustav se sastoji od plinskog kromatografa (model 8890 GC) koji je opremljen automatskim tekućinskim injektorom (model 7693 A) i masenim spektrometrom (model 7000D GC/TQ, sve od Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA). Uzorci su odvojeni korištenjem nepolarne HP-5MS UI kolone (dimenzije: 30 m duljine, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine sloja stacionarne faze 0,25 µm, Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA). Plin nosilac je bio helij s protokom od 1 mL min<sup>-1</sup>. Ulazna temperatura je bila 250 °C, a volumen ubrizganog uzorka 1 µL. Ubrizgavanje je vršeno podijeljenom metodom omjera podjele 1:50. Prijenosna temperatura je postavljena na 280 °C. Program temperature kolone postavljen je na 60 °C prve 3 minute, a zatim zagrijan na 246 °C brzinom 3 °C min<sup>-1</sup> i održavan 25 minuta izotermno. U masenom spektrometru postavljeni su uvjeti: odgoda otapala na 3 minute, temperatura izvora iona 230 °C, energija elektrona od 70 eV (elektronvolti), temperatura kvadrupola je postavljena na 150 °C i raspon skeniranja od 30 m z<sup>-1</sup> do 450 m z<sup>-1</sup>.

### **2.4. Priprema filmova mješavina PHB/SME**

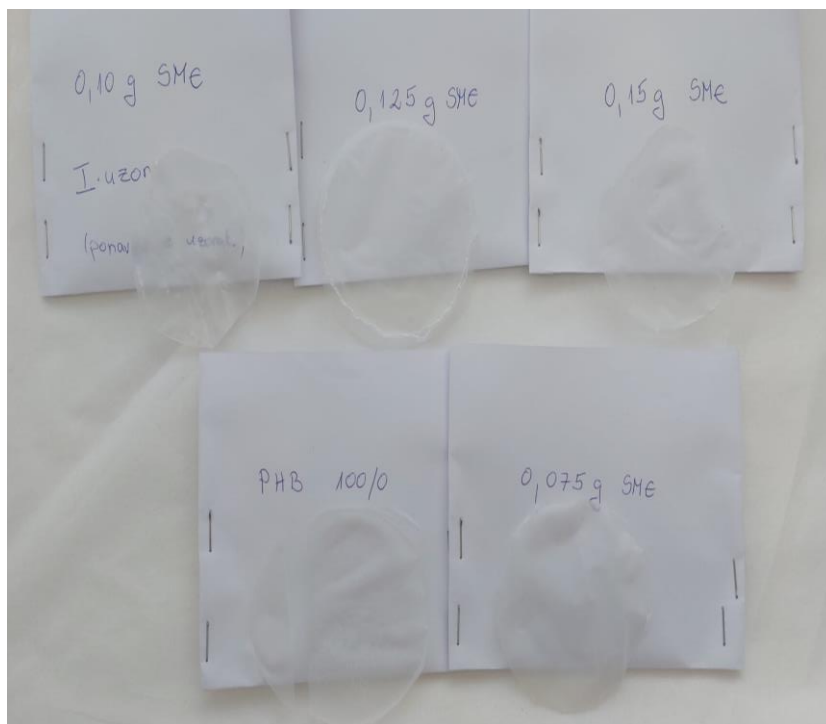
U svrhu pripreve otopina PHB/SME najprije su pripravljene 1 % - tne otopine (w/v) PHB-a u kloroformu otapanjem 0,5 g PHB-a u 50 mL kloroforma u Erlenmeyerovim tikvicama. Zatim je svakoj otopini dodana određena količina SME kako bi se dobile mješavine s 10 mas.%, 15 mas.%, 20 mas.%, 25 mas.% i 30 mas.% omekšavala u odnosu na PHB (znači: 0,05 g, 0,075 g, 0,1 g, 0,125 g i 0,15 g SME). Na slici 10 je



prikazana aparatura za pripremu otopina PHB/SME u kloroformu. Otopinu je potrebno ostaviti da bubri, a zatim se uzorci miješaju uz zagrijavanje do  $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz refluks. Dobivena homogena otopina izlivena je u Petrijevu zdjelicu i ostavljena da otapalo ispari. Ovim postupkom se dobiju filmovi (slika 11 i 12) koji se analiziraju na FTIR i DSC uređaju.



**Slika 10.** Aparatura za pripremu otopina PHB/SME u kloroformu



**Slika 11.** Dobiveni filmovi mješavina PHB/SME



**Slika 12.** Film mješavine PHB/SME 85/15

## 2.5. Određivanje toplinskih svojstava mješavina DSC analizom

Analiza toplinskih svojstava mješavina izvršena je diferencijalnim pretražnim kalorimetrom DSC 823<sup>e</sup> (Mettler Toledo, Švicarska), slika 13.



**Slika 13.** Diferencijalni pretražni kalorimetar, model DSC 823<sup>e</sup>

DSC je termostatiran uz konstantan protok plina ( $30 \text{ mL min}^{-1}$ ). Instrument je kalibriran indijem ( $T_m = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H_m = 28,45 \text{ J g}^{-1}$ ). Prije početka rada sustav je stabiliziran od 0,5 do 1 sata. Ispitci su prvo hlađeni od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  brzinom  $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (prvo hlađenje), zatim zadržani pri toj temperaturi 10 min te zagrijavani od  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  brzinom  $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (prvo zagrijavanje). Pri  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  zadržani su 1 min nakon čega su ponovno ohlađeni na  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  brzinom  $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (drugo hlađenje) i zadržani pri toj temperaturi 10 min. Od  $-50 \text{ }^\circ\text{C}$  ponovno su zagrijani na  $230 \text{ }^\circ\text{C}$  brzinom  $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (drugo zagrijavanje). Svi ispiti su bili mase od oko 12 mg. Mjerenja su provedena u zatvorenim aluminijskim posudicama čije poklopce je potrebno prethodno probušiti iglicom zbog otpuštanja plinovitih produkata. Ispitak se stavi u lijevu ćeliju, a prazna aluminijska posudica s poklopcem u desnu ćeliju mjernog osjetila. Zatim se provodi snimanje i obrada podataka. DSC mjerenja traže provođenje preliminarnog zagrijavanja zbog uklanjanja toplinske prošlosti uzorka.

DSC krivulje prikazuju ovisnost toplinskog toka o temperaturi.

Iz DSC krivulja zagrijavanja određuju se za svaki prijelaz tri karakteristične temperature, ali su za objašnjenje rezultata važne sljedeće značajke:

- temperatura hladne kristalizacije ( $T_{cc} / ^\circ\text{C}$ ), temperatura kristalizacije prije taljenja ( $T_{pmc} / ^\circ\text{C}$ ), temperatura taljenja ( $T_m / ^\circ\text{C}$ )
- toplina hladne kristalizacije ( $\Delta H_{cc} / \text{J g}^{-1}$ ), toplina kristalizacije prije taljenja ( $\Delta H_{pmc} / \text{J g}^{-1}$ ), toplina taljenja ( $\Delta H_m$ )
- temperatura staklastog prijelaza ( $T_g / ^\circ\text{C}$ )
- promjena specifičnog toplinskog kapaciteta staklastog prijelaza ( $\Delta c_p / \text{J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ).

Iz krivulje hlađenja mogu se odrediti sljedeće značajke:

- temperatura kristalizacije iz taline ( $T_{mc} / ^\circ\text{C}$ )
- toplina kristalizacije iz taline ( $\Delta H_{mc} / \text{J g}^{-1}$ )

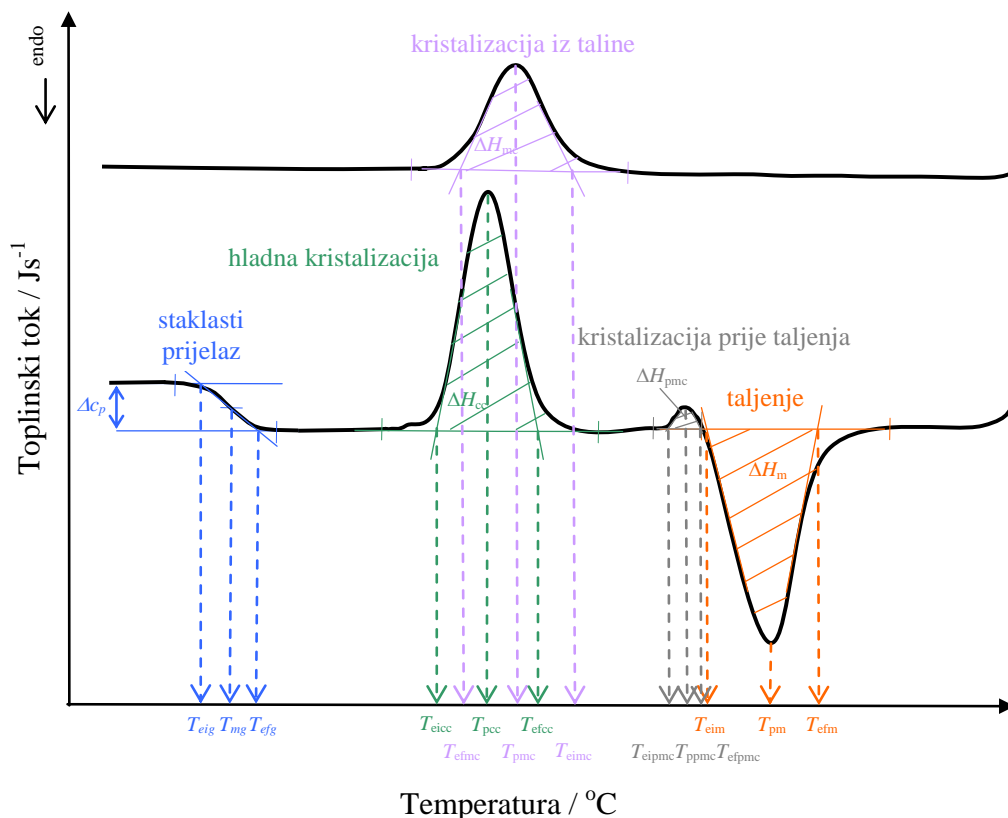
Sukladno hrvatskoj normi HRN EN ISO 11357-3:2009 za određivanje toplinskih prijelaza pomoću DSC-a, a u slučaju kristalizacije i taljenja, određene su:

- ekstrapolirana početna temperatura prijelaza,  $T_{ei}$  (npr.  $T_{efm}$  - ekstrapolirana početna temperature taljenja) /  $^\circ\text{C}$
- temperatura u vršku endoterme ili egzoterme,  $T_p / ^\circ\text{C}$
- ekstrapolirana konačna temperatura prijelaza,  $T_{ef}$  (npr.  $T_{efm}$  - ekstrapolirana konačna temperature taljenja) /  $^\circ\text{C}$ .

Kod staklastog prijelaza sukladno hrvatskoj normi HRN ISO 11357-2:2009, određene su:

- ekstrapolirana početna temperature prijelaza,  $T_{eig} / ^\circ\text{C}$
- temperatura pri kojoj je promjena toplinskog kapaciteta jednaka polovini njegove maksimalne vrijednosti,  $T_{mg} / ^\circ\text{C}$
- ekstrapolirana konačna temperature prijelaza,  $T_{efg} / ^\circ\text{C}$ .

Na slici 14 prikazano je određivanje prijelaza iz krivulja zagrijavanja i hlađenja. U DSC analizi provode se dva zagrijavanja. Prvo zagrijavanje služi da bi se poništila toplinska „povijest“ uzorka, dok se relevantni podatci očitavaju iz krivulje drugog zagrijavanja.



**Slika 14.** Određivanje značajki krivulje diferencijalne pretražne kalorimetrije<sup>29</sup>

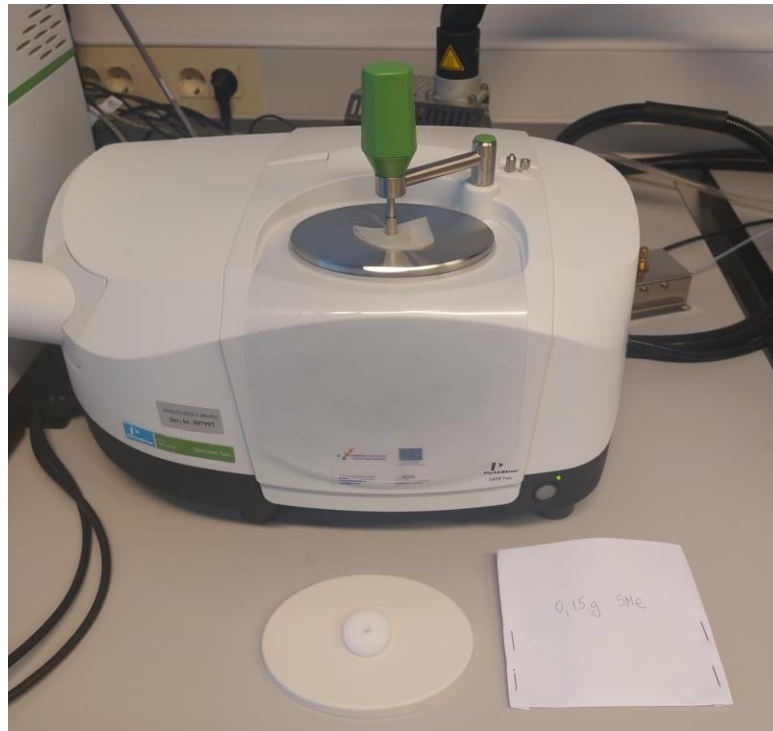
Pomoću vrijednosti topline taljenja ( $\Delta H_m$ ) i topline kristalizacije ( $\Delta H_c$ ) tijekom zagrijavanja (hladna kristalizacija i kristalizacija prije taljenja) PHB-a u uzorcima te topline taljenja potpuno kristalnog PHB-a ( $\Delta H_{100\%}$ ) moguće je izračunati stupanj kristalnosti uzorka ( $X_c$ ) na temelju izraza:<sup>4</sup>

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_{100\%} \times w_{PHB}} \quad (\%) \quad (1)$$

gdje  $\Delta H_{100\%}$  iznosi  $146 \text{ J g}^{-1}$ , a  $w$  predstavlja maseni udio PHB-a u uzorcima.

## 2.6. Određivanje interakcija u mješavini PHB/SME primjenom FTIR-a

Za određivanje međumolekulnih interakcija između PHB-a i SME upotrijebljena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) provedena na FTIR spektrometru Spectrum Two (*PerkinElmer*, SAD) u području valnih brojeva  $\bar{\nu} = 4000\text{-}450 \text{ cm}^{-1}$ , pri rezoluciji od  $4 \text{ cm}^{-1}$  i 10 snimaka pri  $25 \text{ °C}$ , slika 15.



**Slika 15.** FTIR spektrometar (UATR Two, PerkinElmer)

FTIR spektri ispitaka snimljeni su tehnikom univerzalne prigušne totalne refleksije (engl. *Universall Attenuated Total Reflectance*, UATR) na dijamantnom refleksijskom elementu pomoću Perkin Elmerovog Spectrum IR računalnog programa.

Ispitak se stavi na kristal visokog refrakcijskog indeksa, osigura dobar kontakt ispitka s kristalom te snimi spektar. Mogu se koristiti različiti kristali, a u ovom slučaju to je dijamant. Ispitak se stavi u FTIR spektrometar te se pomoću korelacijskih tablica s karakterističnim vibracijama i usporedbom sa spektrogramima čistog PHB-a i smjese metilnih estera identificiraju vrpce u mješavinama PHB/SME. Prije spektroskopiranja ispitaka provodi se referentno mjerenje kojim se snimi spektar podloge na koju su ispitci nanešeni ili se snimi okolina ispitka. Na taj način se omogući pozadinska korekcija (engl. *background*) te se dobije spektar koji potječe isključivo od ispitka.

### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

### 3.1. Određivanje gustoće i viskoznosti smjese metilnih estera

#### 3.1.1. Određivanje gustoće pomoću odmjerne tikvice

$$\rho = \frac{m}{V}$$

$$m \text{ (prazna tikvica)} = 10,2676 \text{ g}$$

$$m \text{ (tikvica+uzorak)} = 19,0680 \text{ g}$$

$$m \text{ (uzorak)} = 8,8004 \text{ g}$$

$$\rho = \frac{8,8004 \text{ g}}{10 \text{ cm}^3} = 0,88004 \text{ g cm}^{-3}$$

#### 3.1.2. Određivanje gustoće pomoću areometra

$$\rho = 0,885 \text{ g cm}^{-3}$$

#### 3.1.3. Određivanje viskoznosti

$$\nu = k \times t$$

1. Mjerenje:  $t = 5 \text{ min } 3 \text{ s} = 303 \text{ s}$

2. Mjerenje:  $t = 5 \text{ min } 4 \text{ s} = 304 \text{ s}$

3. Mjerenje:  $t = 5 \text{ min } 4 \text{ s} = 304 \text{ s}$

$$\bar{t} = \frac{(303 + 304 + 304) \text{ s}}{3} = 303,666 \text{ s}$$

$$k = 0,01597 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \text{ pri } 40 \text{ }^\circ\text{C}$$

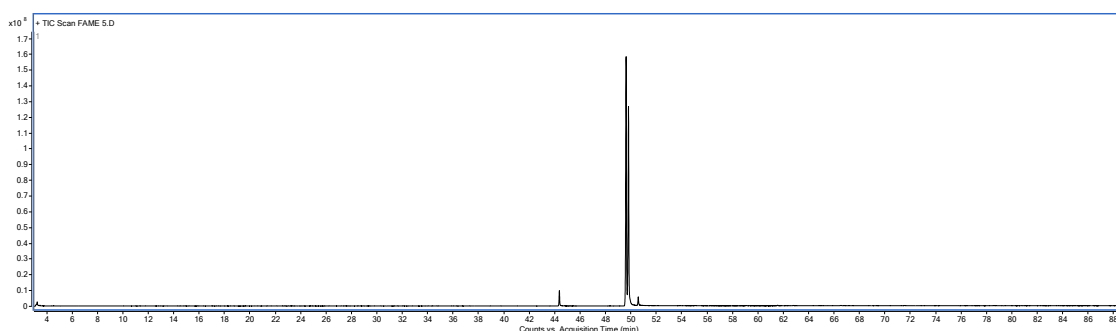
$$\nu = 0,01597 \text{ mm}^2/\text{s}^2 \times 303,666 \text{ s} = 4,85 \text{ mm}^2/\text{s}$$

Dobivene vrijednosti gustoće pri 20 °C i kinematičke viskoznosti pri 40 °C smjese metilnih estera odgovaraju vrijednostima koje se inače koriste za biodizel, prema normi EN 14214.



### 3.2. Analiza SME

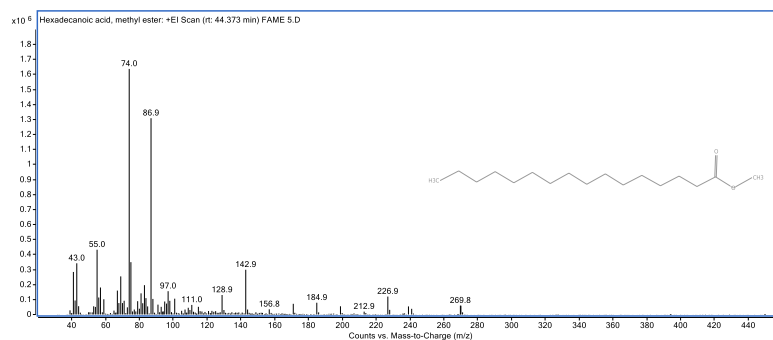
Na slici 16 prikazan je kromatogram SME s 4 osnovna pika, koja prema spektrima masa, slika 17, odgovaraju metilnim esterima kako je navedeno u tablici 2. Identifikacija je provedena uspoređujući spektre, retencijska vremena, Kovatsove indekse zadržavanja (u odnosu na C<sub>8</sub> - C<sub>40</sub> n-alkane za HP-5MS kolonu) s onima iz literature (ADAMS ref.), knjižnice i/ili autentičnih uzoraka kao i uspoređujući njihove masene spektre s literaturom, Wiley 9N08 (Wiley, New York, NY, USA) i NIST 17 (Gaithersburg, MD, USA) spektralne mase baze podataka.



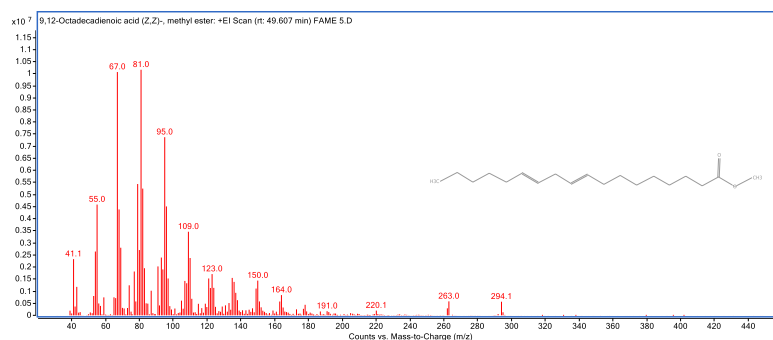
Slika 16. Kromatogram smjese metilnih estera masnih kiselina

Tablica 2. Rezultati GC-MS analize smjese metilnih estera

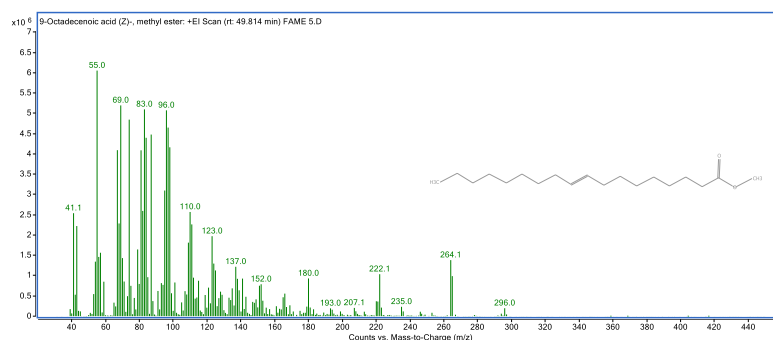
		<b>Rt-HP- 5MS/min</b>	<b>KI</b>	<b>Identifikacijska metoda</b>	<b>Maseni udio /%</b>
1.	3-etil-heksan	3,255	<800	MS	0,5
2.	Metilni ester palmitinske kiseline	44,370	1924	MS, KI	2,8
3.	Metilni ester linolne kiseline	49,628	2092	MS, KI	53,2
4.	Metilni ester oleinske kiseline	49,814	2098	MS, KI	41,3
5.	Metilni ester stearinske kiseline	50,581	2124	MS, KI	1,8
Ukupno					99,2



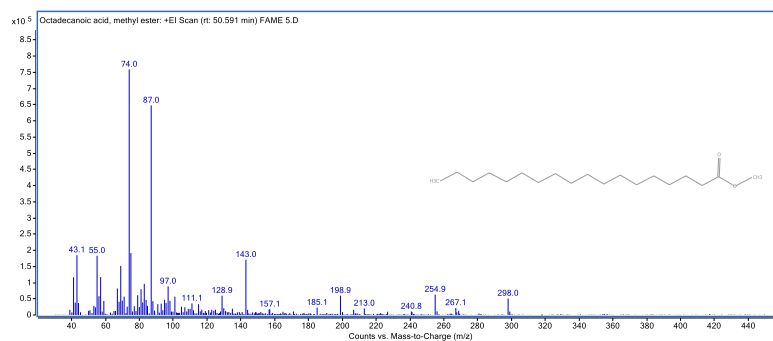
a) Metilni ester palmitinske kiseline



b) Metilni ester linolne kiseline



c) Metilni ester oleinske kiseline



d) Metilni ester stearinske kiseline

**Slika 17.** Spektri masa pojedinih metilnih estera masnih kiseline dobivenih transesterifikacijom otpadnih jestivih ulja

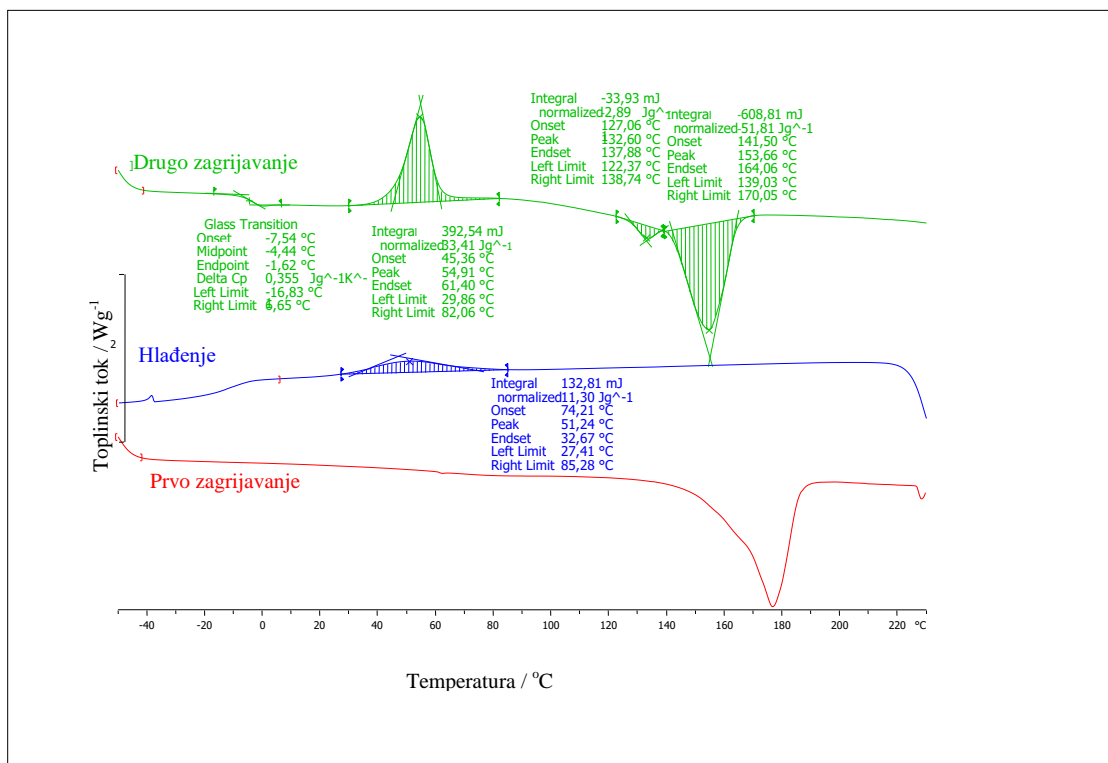
**Rt-HP-5MS/min** – vrijeme retencije odnosno zadržavanja na HP-5MS koloni

**KI** – Kovatsov indeks zadržavanja

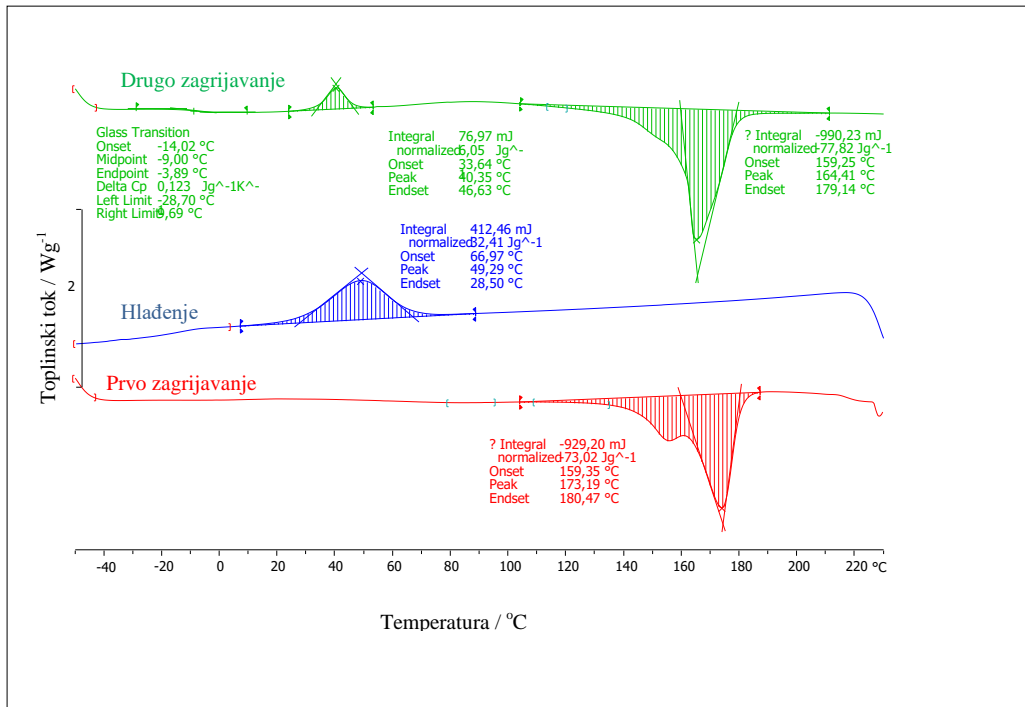
Uzorak sadrži estere palmitinske, linoleinske, oleinske i stearinske kiseline te se na temelju dobivenih rezultata zaključuje da je riječ o relativno čistom uzorku smjese metilnih estera masnih kiselina. Iz dobivenih rezultata također se može zaključiti da smjesa metilnih estera masnih kiselina sadrži oko 5 % zasićenih masnih kiselina i oko 94 % nezasićenih masnih kiselina. Prema omjerima estera u smjesi pretpostavlja se da je ulje smjesa suncokretovog i sojinog ulja.<sup>30</sup> U uzorku je prisutan i 3-etil-heksan što nije svojstveno za smjesu metilnih estera masnih kiselina i 0,8 % komponenti koje nije bilo moguće identificirati.

### 3.3. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

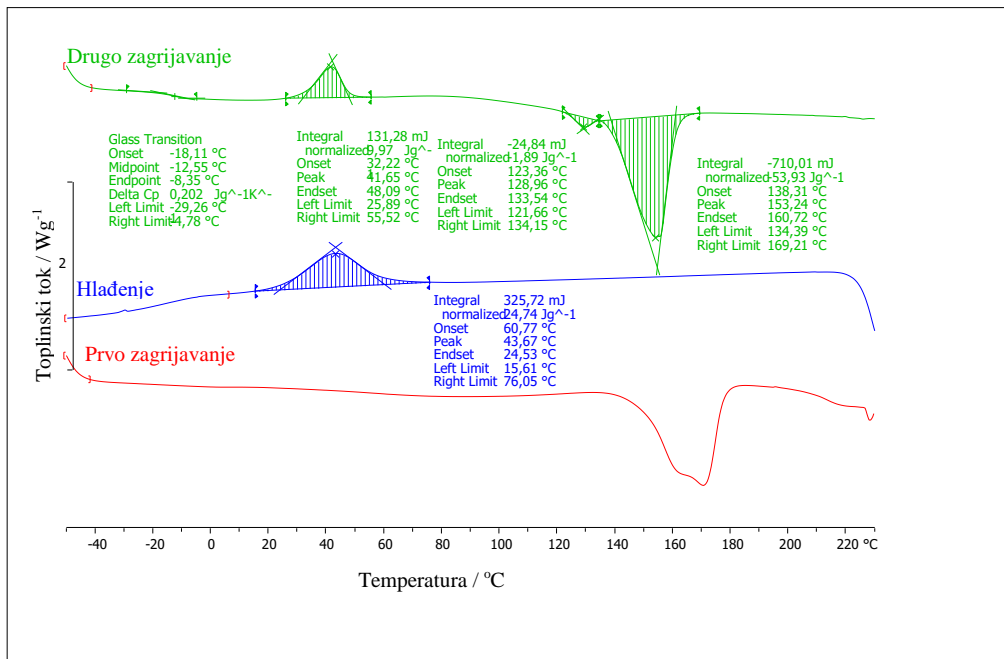
Primjenom DSC-a sagledan je utjecaj biorazgradljivog omekšavala na toplinska svojstva biorazgradljivog polimera. Normalizirane DSC krivulje zagrijavanja i hlađenja su prikazane na slikama 18-23. Normalizirati krivulju znači svesti masu na 1 g u svrhu uspoređivanja toplinskih efekata. Značajke DSC krivulja hlađenja i drugog zagrijavanja (kristalište, talište i staklište) prikazane su u tablicama 3 i 4.



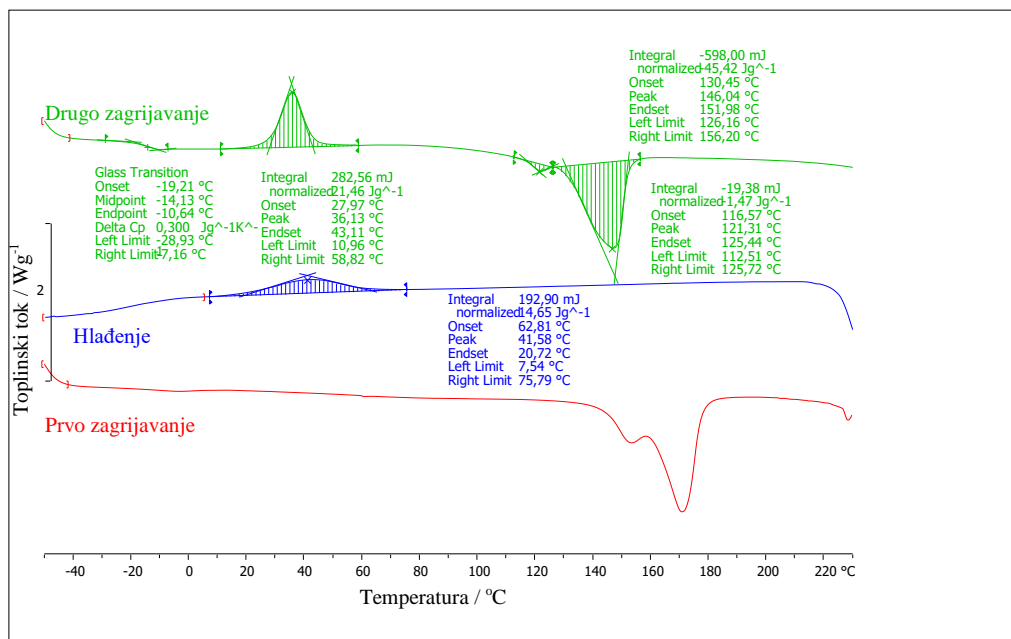
Slika 18. Normalizirana DSC krivulja filma PHB 100/0



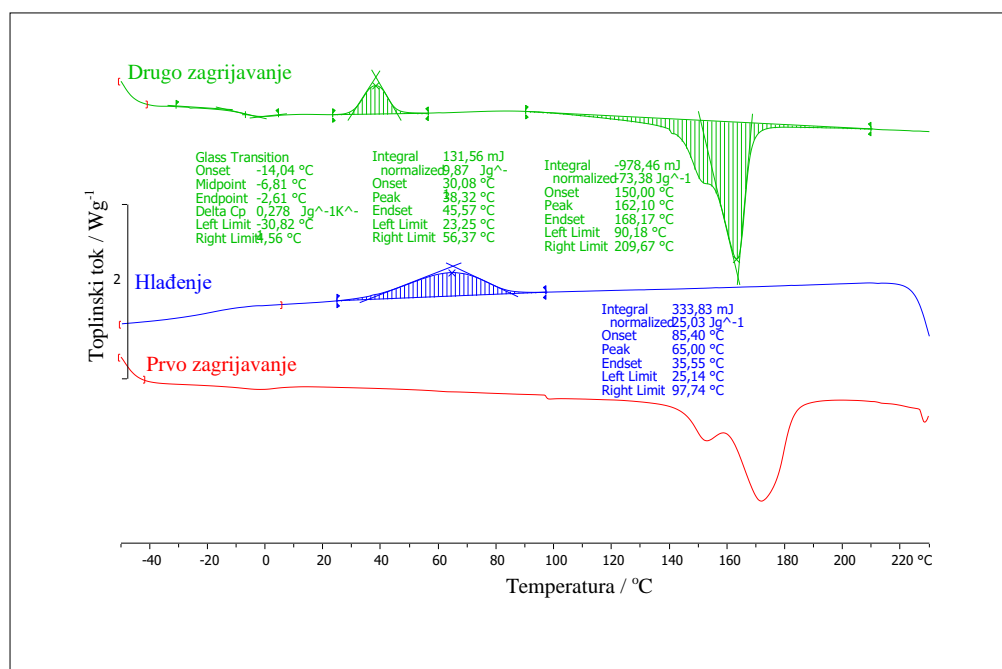
**Slika 19.** Normalizirana DSC krivulja filma PHB/SME 90/10



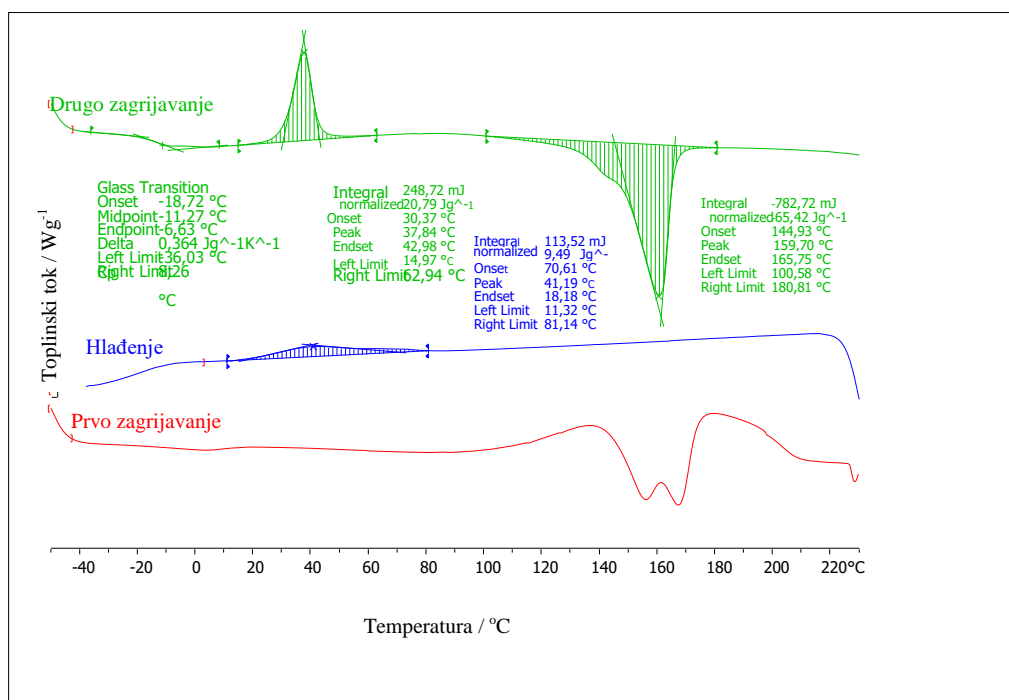
**Slika 20.** Normalizirana DSC krivulja filma PHB/SME 85/15



**Slika 21.** Normalizirana DSC krivulja filma PHB/SME 80/20



**Slika 22.** Normalizirana DSC krivulja filma PHB/SME 75/25



Slika 23. Normalizirana DSC krivulja filma PHB/SME 70/30

Tablica 3. Značajke DSC krivulja hlađenja PHB i mješavina PHB/SME

Filmovi PHB/SME	$T_{eimc} / ^\circ\text{C}$	$T_{pmc} / ^\circ\text{C}$	$T_{efmc} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{mc} / \text{J g}^{-1}$
100/0	74	51	33	11,30
90/10	67	49	29	32,41 (36,01)*
85/15	61	44	25	24,74 (29,11)*
80/20	63	42	21	14,65 (18,31)*
75/25	85	65	36	25,03 (33,37)*
70/30	71	41	18	9,49 (13,56)*

\*za vrijednosti u zagradama uzet je u obzir maseni udio PHB-a u mješavinama

**Tablica 4.** Značajke DSC krivulja drugog zagrijavanja filma PHB i filmova PHB/SME

Filmovi PHB/SME	Područje staklastog prijelaza			Područje hladne kristalizacije				Područje taljenja I				Područje taljenja II				$X_c /$ %
	$T_{eig} /$ °C	$T_{mg} /$ °C	$T_{efg} /$ °C	$T_{eicc} /$ °C	$T_{pcc} /$ °C	$T_{efcc} /$ °C	$\Delta H_{cc} /$ J g <sup>-1</sup>	$T_{eim1} /$ °C	$T_{pm1} /$ °C	$T_{efm1} /$ °C	$\Delta H_{m1} /$ J g <sup>-1</sup>	$T_{eim2} /$ °C	$T_{pm2} /$ °C	$T_{efm2} /$ °C	$\Delta H_{m2} /$ J g <sup>-1</sup>	
<b>100/0</b>	-8	-4	-2	45	55	61	33,41	127	133	138	2,89	142	154	164	51,81	15
<b>90/10</b>	-14	-9	-4	34	40	47	6,05	-	-	-	-	159	164	179	77,82	55
<b>85/15</b>	-18	-13	-8	32	42	48	9,97	123	129	134	1,89	138	153	161	53,93	37
<b>80/20</b>	-19	-14	-11	28	36	43	21,46	117	121	125	1,47	130	146	152	45,42	22
<b>75/25</b>	-14	-7	-3	30	38	46	9,87	-	-	-	-	150	162	168	73,38	58
<b>70/30</b>	-19	-11	-7	30	38	43	20,79	-	-	-	-	145	160	166	65,42	44

\*obojeni stupci ukazuju na najznačajnije DSC značajke drugog zagrijavanja



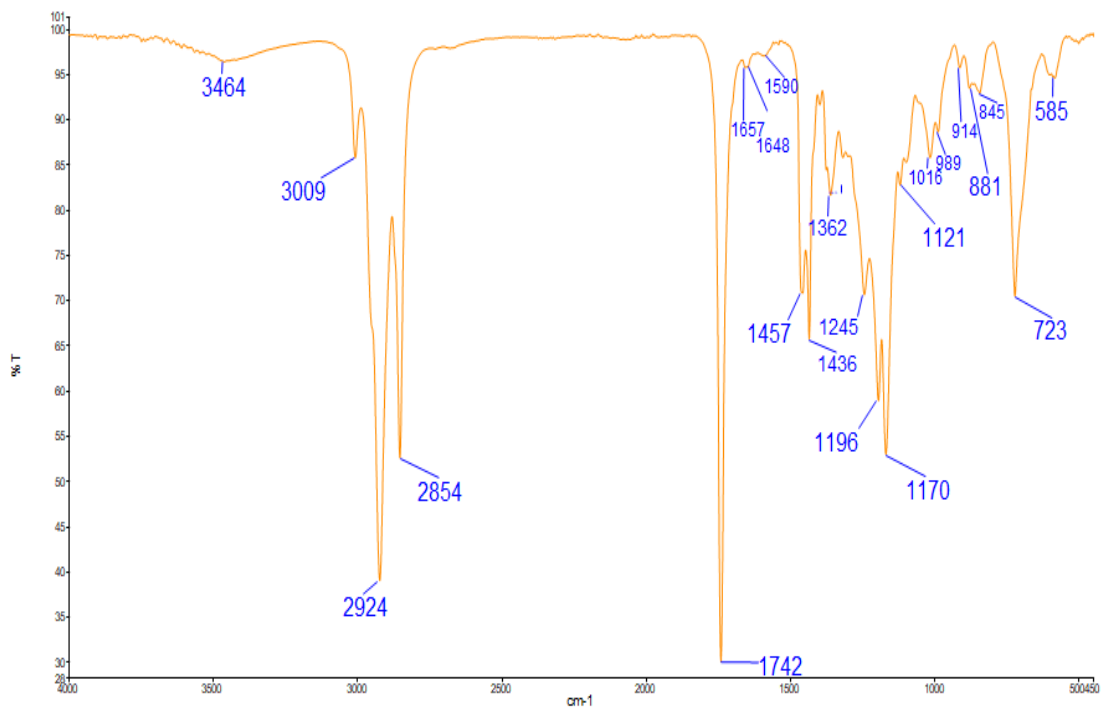
DSC krivulje filmova PHB/SME pokazuju iste fazne prijelaze kao i film PHB 100/0. Iz podataka dobivenih iz krivulja hlađenja, slike 23-28, prikazanih u tablici 3, uočava se da kristalizacija PHB-a u većini istraživanih mješavina počinje kasnije, tj. pri nižim temperaturama u odnosu na čisti PHB. Izuzetak je mješavina PHB/SME 70/30 u kojoj se kristalizacija PHB-a odvija pri desetak stupnjeva višoj temperaturi. Topline kristalizacije PHB-a u mješavina u nekim slučajevima su i do tri puta veće od topline kristalizacije čistog PHB-a. S obzirom da se entalpija kristalizacije odnosi na jediničnu masu uzorka, očito je da je entalpija kristalizacije po jediničnoj masi PHB-a veća (vrijednosti u zagradama u tablici 3). Iz iznesenog se može zaključiti da omekšavalo olakšava kristalizaciju PHB-a u mješavinama, ali je i odgađa. To bi se moglo objasniti na sljedeći način: viskoznost polimerne taline u kojoj se nalazi omekšavalo je niža pa relativno nefleksibilne makromolekule PHB-a imaju bolje uvjete za sređivanje nadmolekulske strukture tijekom hlađenja, a time i lakšu kristalizaciju.

Iz DSC krivulja drugog zagrijavanja, koje su prikazane na slikama 23-28, vidljivo je da je staklište čistog PHB-a izraženije u odnosu na staklišta ostalih filmova PHB/SME, odnosno da je veća promjena specifičnog toplinskog kapaciteta u području staklastog prijelaza kod PHB-a. Iz DSC krivulja očitani su parametri toplinskih prijelaza i prikazani u tablici 4. Staklište filma PHB je  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i dodatkom SME snižava se do  $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ . S obzirom da snižavanje staklišta ne pokazuje konkretnu ovisnost o masenom udjelu omekšavala, vjerojatno je pri eksperimentalnom radu došlo do odstupanja u omjeru komponenata u mješavini. Pik hladne kristalizacije, a time i toplina hladne kristalizacije, su izraženiji kod čistog PHB-a i PHB/SME 70/30. Međutim, iako je toplina hladne kristalizacije najveća kod čistog PHB-a, hladna kristalizacija PHB-a u mješavinama započinje ranije. Dakle, slično kao i kod kristalizacije iz taline, omekšavalo olakšava i hladnu kristalizaciju PHB-a. Pojava pika hladne kristalizacije pokazuje da tijekom hlađenja mješavine PHB ne uspijeva u potpunosti kristalizirati, vjerojatno zbog prevelike brzine hlađenja ili zbog utjecaja omekšavala na kristalizaciju PHB-a iz taline. Zagrijavanjem, nakon toga, povećava se gibljivost polimernih lanaca PHB-a te se odvija hladna kristalizacija. Nakon hladne kristalizacije slijedi taljenje kristalnih područja u PHB-u. Uočavaju se dva tališta ili jedno bimodalno talište, što ukazuje na dvije različite kristalne faze (osim kod PHB 90/10) koje nastaju tijekom hlađenja i zagrijavanja mješavina. U mješavinama u kojima je moguće odrediti oba tališta (85/15, 80/20) te vrijednosti su niže nego kod PHB-a. Ukupni stupanj kristalnosti

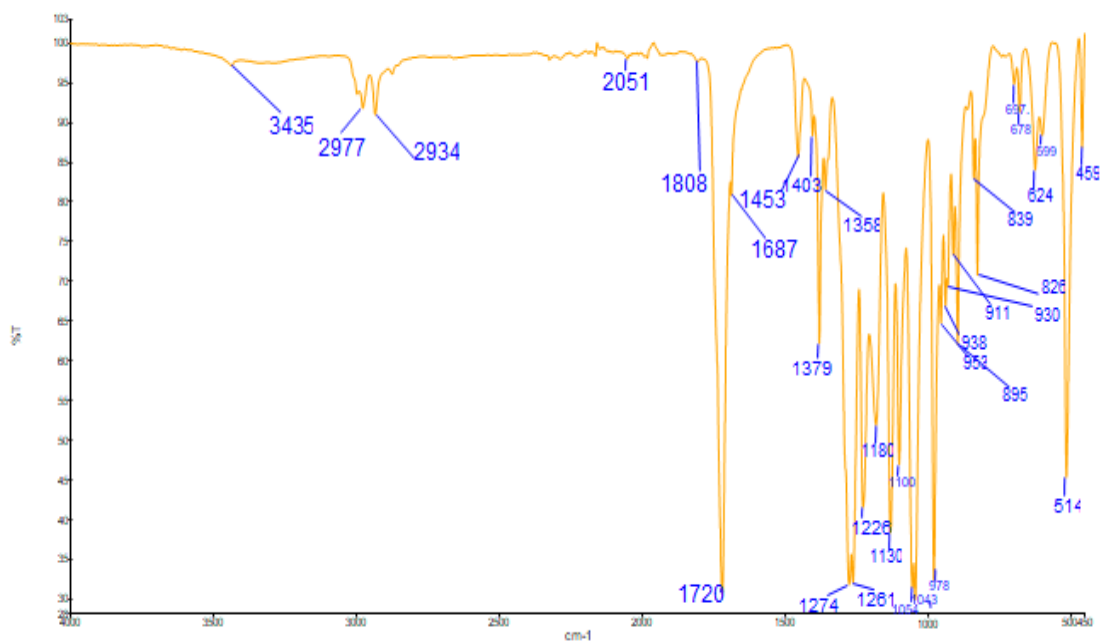
PHB-a u mješavinama,  $X_c$ , izračunat prema izrazu (1), pokazuje relativno nizak stupanj kristalnosti mješavine 100/0, koji iznosi 15 %. Mješavine PHB/SME imaju znatno veći stupanj kristalnosti, neke i preko 50 %.

### 3.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom-transformacijom

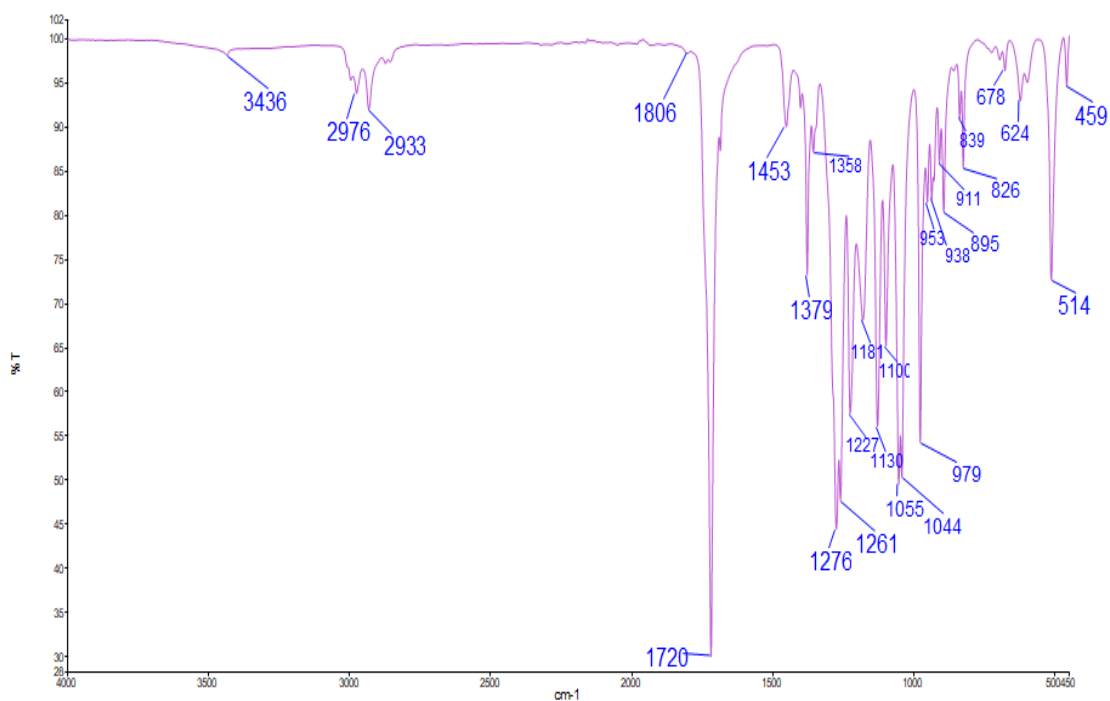
FTIR spektri mješavina PHB/SME, PHB i smjese metilnih estera masnih kiselina prikazani su na slikama 24-30, a valni brojevi karakterističnih vrpci prikazani su u tablici 5. Cilj FTIR analize je utvrditi eventualne promjene u položaju apsorpcijskih vrpci PHB-a zbog prisustva omekšavala odnosno SME.



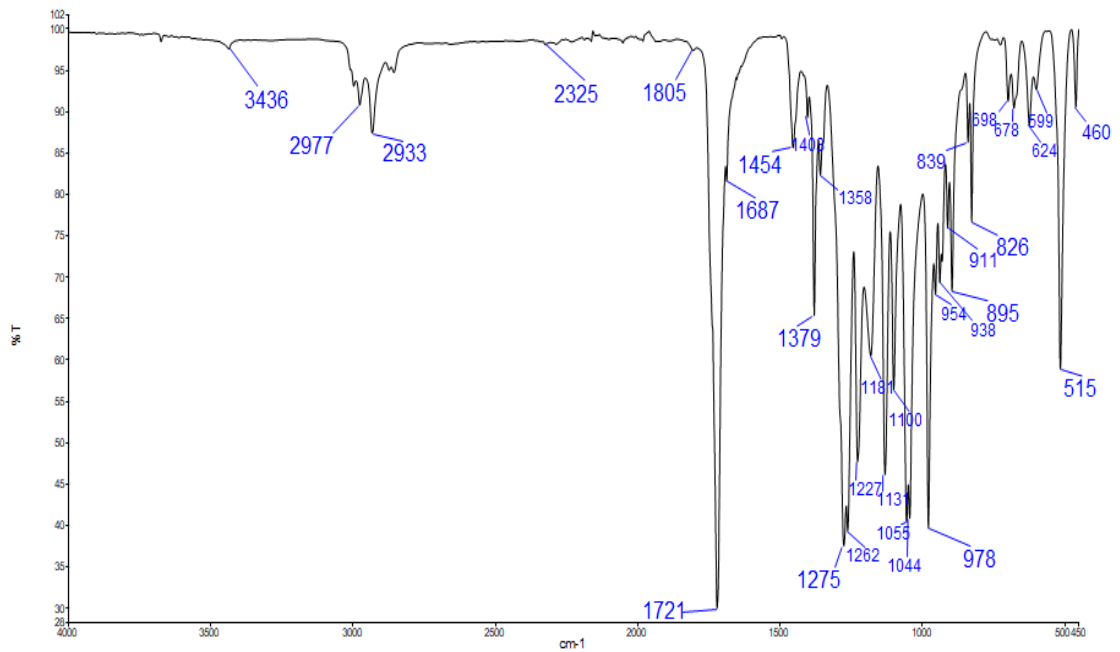
Slika 24. FTIR spektar filma SME



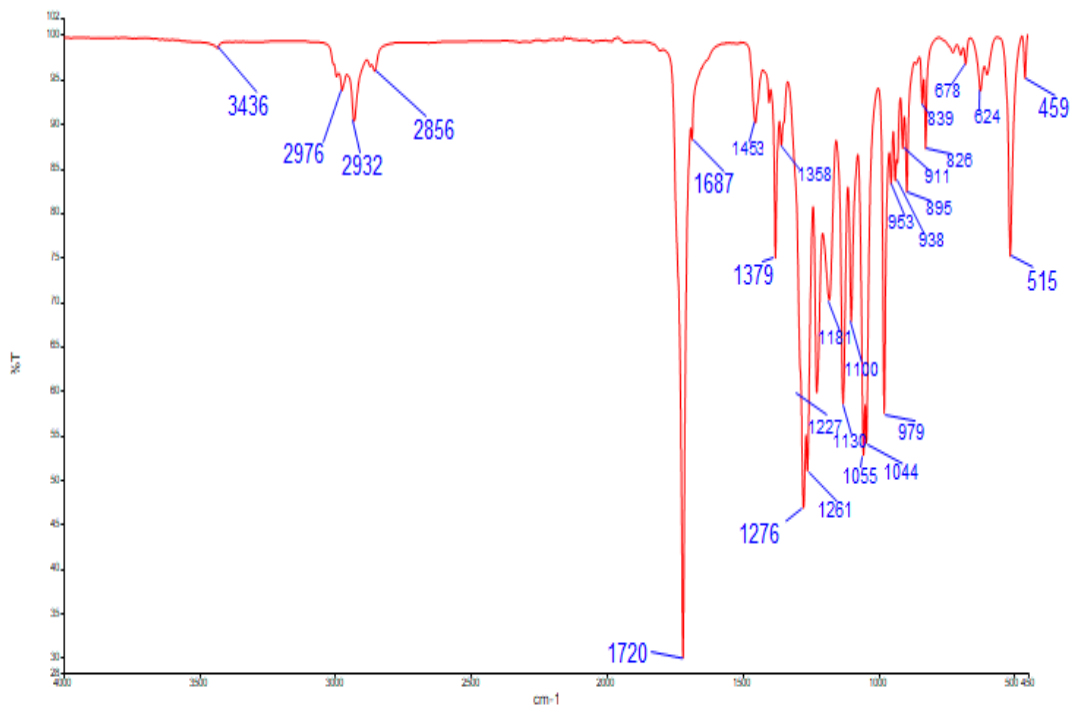
**Slika 25.** FTIR spektar filma PHB 100/0



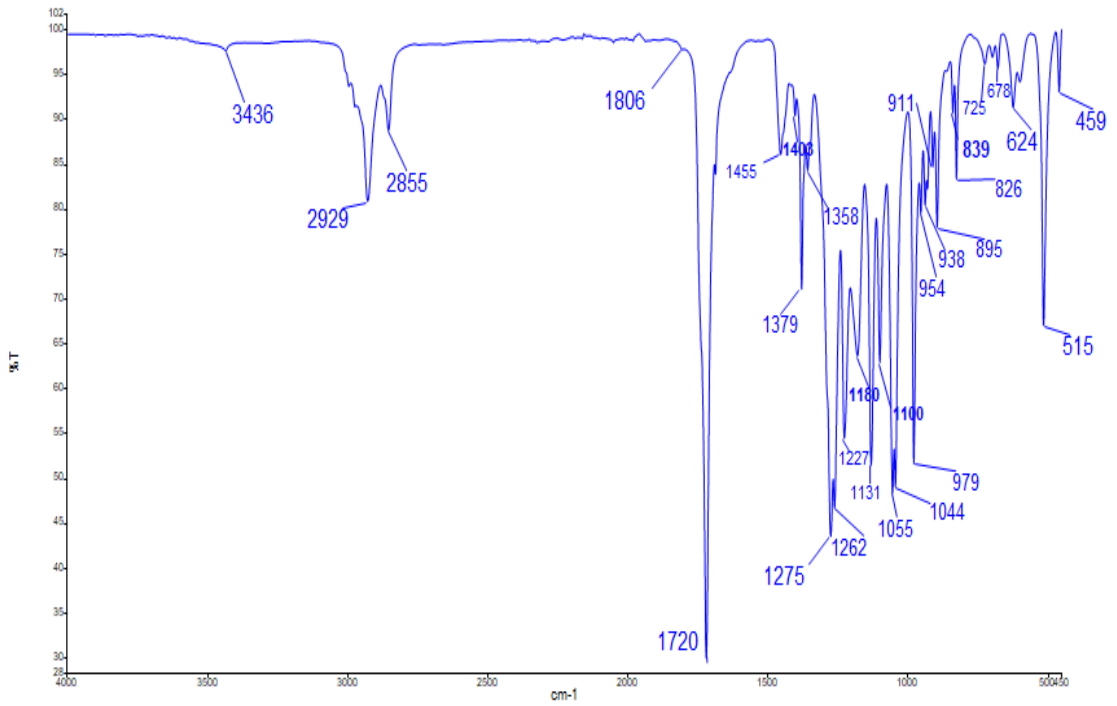
**Slika 26.** FTIR spektar filma PHB/SME 90/10



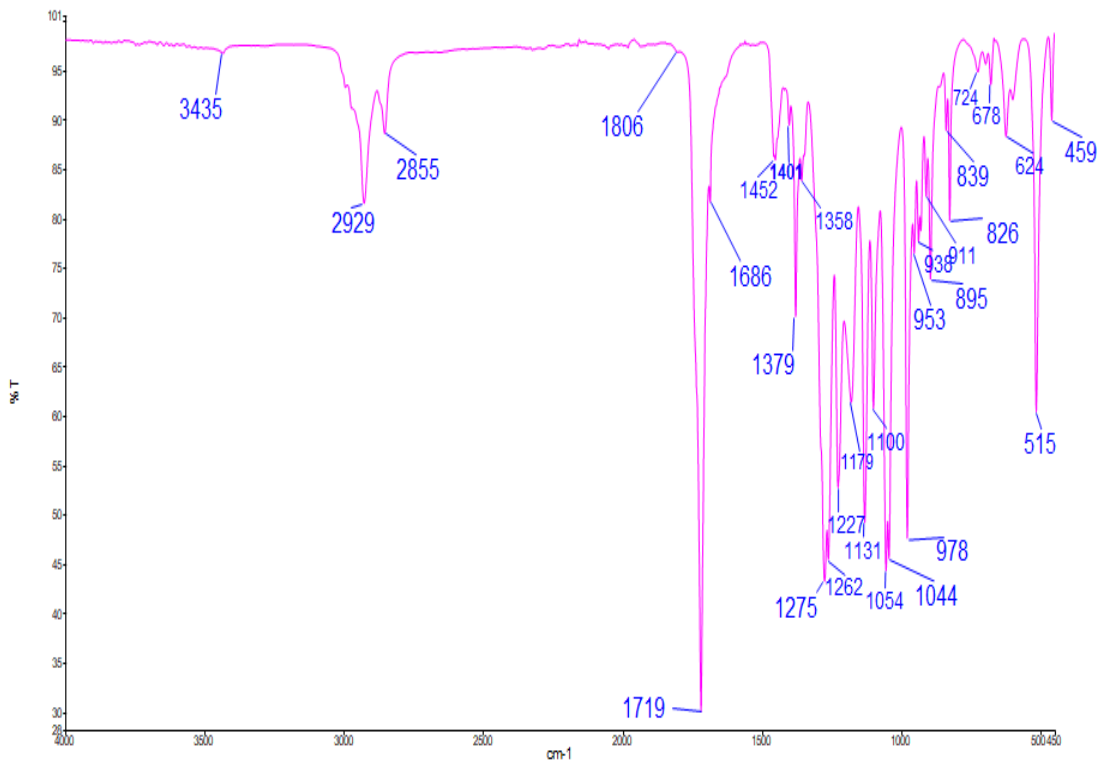
**Slika 27.** FTIR spektar filma PHB/SME 85/15



**Slika 28.** FTIR spektar filma PHB/SME 80/20



**Slika 29.** FTIR spektar filma PHB/SME 75/25



**Slika 30.** FTIR spektar filma PHB/SME 70/30

**Tablica 5.** Karakteristične apsorpcijske vrpce filmova PHB/SME i SME

Filmovi PHB/SME	VIBRACIJA / valni broj, cm <sup>-1</sup>							
	istezanje terminalnih OH	-CH istezanje	-C=O istezanje	-CH <sub>2</sub> asim. savijanje	-CH <sub>3</sub> sim. savijanje	C-O istezanje	C-C istezanje	-CH <sub>2</sub> ljuljanje
<b>100/0</b>	3435	2977, 2934	1720	1453	1379	1274	-	-
<b>90/10</b>	3436	2976, 2933	1720	1453	1379	1276	-	-
<b>85/15</b>	3436	2977, 2933	1721	1454	1379	1275	-	-
<b>80/20</b>	3436	2976, 2932, 2856	1720	1453	1379	1276	-	-
<b>75/25</b>	3436	2929, 2855	1720	1455	1379	1275	-	-
<b>70/30</b>	3435	2929, 2855	1719	1452	1379	1275	-	-
<b>SME</b>	3464	3009	1742	-	-	1170, 1196	1245	723

Nakon snimanja spektara uzoraka mješavina PHB/SME najprije su identificirane karakteristične vrpce mješavine filma PHB/SME 100/0 i SME te uspoređeni sa FTIR spektrima PHB-a odnosno SME iz literature.<sup>31,32</sup>

U mješavini PHB/SME 100/0 vrpca pri  $3435\text{ cm}^{-1}$  odgovara istezanju krajnjih  $\text{-OH}$  skupina u lancima polimera i njihov položaj se ne mijenja dodatkom SME. Pri  $2977$  i  $2934\text{ cm}^{-1}$  pojavljuju se vrpce koje odgovaraju istezanju C-H veza. U mješavinama s 20, 25 i 30 % SME smanjen je intenzitet ili nestaje vrpca pri  $2977\text{ cm}^{-1}$ , a pojavljuje se vrpca pri oko  $2855\text{ cm}^{-1}$ . Općenito, u polimerima pomicanje vrpce prema manjim valnim duljinama označava ograničenje mogućnost određenih vibracija. U ovom slučaju to ograničenje vibracija, odnosno savijanja C-H veza, moglo bi se objasniti većim stupnjem kristalnosti PHB-a u mješavinama sa SME. Najizraženija vrpce u spektru PHB-a je pri  $1720$  i  $1275\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju istezanju  $\text{-C=O}$  odnosno  $\text{-C-O}$  skupina u poliesteru. Vrpca pri  $1453\text{ cm}^{-1}$  predstavlja asimetrično savijanje u  $\text{-CH}_2$  skupini, a vrpca pri  $1379\text{ cm}^{-1}$  odgovara simetričnom savijanju u  $\text{-CH}_3$  skupini. Sve navedene vrpce pojavljuju se pri istim valnim duljinama u svim mješavinama PHB/SME.

Karakteristične vrpce smjese niskomolekulnih metilnih estera masnih kiselina pri  $1742$ ,  $1170$  i  $1196\text{ cm}^{-1}$  ne uočavaju se jer su te vibracije mnogo manjeg intenziteta u odnosu na vibracije u polimernim molekulama sastavljenim od velikog broja ponavljajućih jedinica.

## **4. ZAKLJUČAK**



Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti:

- GC-MS analizom smjese metilnih estera utvrđeno je da se smjesa sastoji od metilnih estera dviju zasićenih masnih kiselina (palmitinske i stearinske) (oko 5 %) i metilnih estera dviju nezasićenih masnih kiselina (oleinske i linolne) (oko 94 %).
- Polimerni filmovi PHB/SME uspješno su pripremljeni tehnikom lijevanja filmova iz otopine komponenata u kloroformu.
- DSC analizom utvrđeno je da se staklišta PHB-a snižava dodatkom omekšavala SME u odnosu na čisti PHB za oko 10 °C te se time proširuje upotrebljivost polimera pri nižim temperaturama.
- SME ne snižava značajno talište PHB-a, a time ni temperaturu preradbe.
- SME povećava stupanj kristalnosti PHB-a, što vjerojatno poboljšava barijerna svojstva materijala.
- U spektru uzoraka bilo je moguće odrediti karakteristične skupine koje se nalaze u strukturi materijala usporedbom sa spektrima ishodnih komponenata.
- Značajnija promjena FTIR spektra PHB-a s dodatkom SME se nije uočila jer su pomaci apsorpcijskih vrpca neznatni.
- Da bi se dobio uvid u svojstva mješavina PHB/SME i njihovu mogućnost primjene nužno je ispitati mehanička svojstva.

## **5. LITERATURA**

1. *B. Andričić*, Polimerni materijali,  
URL: <https://www.ktf.unist.hr/index.php/nastavni-materijali-knjiznice/repozitorij-265?start=40> (5.10.2022.)
2. URL:[https://si.openprof.com/ge/images/129/polimerizacija\\_shema.png](https://si.openprof.com/ge/images/129/polimerizacija_shema.png)  
(29.9.2022.)
3. *B. Andričić*, Prirodni polimerni materijali, Priručnik, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009, str. 1-3.
4. *M. Erceg*, Modificiranje svojstava biorazgradivog poli(3-hidroksibutirata), Doktorski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split, 2007, str. 1-17.
5. *D. M. A. Zeid*, Anaerobic Biodegradation of Natural and Synthetic Polyesters, Doktorski rad, Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhemina, Braunschweig, 2001, str.7.
6. ISO 472:1999 Plastics – Vocabulary
7. HRN EN 13432:2003 Ambalaža – Zahtjevi za oporabivost ambalaže kompostiranjem i biorazgradnjom – Sheme ispitivanja i kriteriji prihvatljivosti ambalaže
8. *D. Z. Bucci, L. B. B.Tavares, I. Sell*, Polym.Test. **24** (2005) 564-571., doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2005.02.008>
9. *Y. A. Trotsenko, L. L. Belova*, Microbiol. **69** (2000) 753-763.
10. *N. Mercan, B. Aslim, N. Yüksekdağ, Y.Beyatli*, Turk. J. Biol. **26** (2002) 215-219.
11. URL:[https://www.researchgate.net/profile/Marcia-Duarte-7/publication/321234065/figure/fig1/AS:667983919718406@1536271185708/a-Granules-of-PHB-accumulated-in-the-cell-of-the-bacterium-Azobacter-chroococcum-2\\_W640.jpg](https://www.researchgate.net/profile/Marcia-Duarte-7/publication/321234065/figure/fig1/AS:667983919718406@1536271185708/a-Granules-of-PHB-accumulated-in-the-cell-of-the-bacterium-Azobacter-chroococcum-2_W640.jpg) (29.9.2022.)
12. *J. A. Ramsay, E. Berger, R. Voyer, C.Chavarie, B. A. Ramsay*, Biotechnol. Tech. **8** (1994) 589-594.
13. *S. Y. Lee, J-I. Choi, K. Han, J. Y. Song*, Appl. Evrion. Microbiol. **65** (1999) 2762-2764, doi: <https://doi.org/10.1128%2Faem.65.6.2762-2764.1999>
14. URL:[https://www.researchgate.net/publication/339603377/figure/fig1/AS:864323010326529@1583082072568/Chemical-structure-of-poly3-hydroxybutyrate-PHB\\_W640.jpg](https://www.researchgate.net/publication/339603377/figure/fig1/AS:864323010326529@1583082072568/Chemical-structure-of-poly3-hydroxybutyrate-PHB_W640.jpg) (29.9.2022.)
15. URL:[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Micrografia\\_di\\_cristalli\\_sferulitici\\_di\\_poli\(idrossi\\_butirrato\)\\_\(PHB\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Micrografia_di_cristalli_sferulitici_di_poli(idrossi_butirrato)_(PHB).jpg) (29.9.2022.)
16. *E. G. Fernandes, M. Pietrini, E. Chiellini*, Macrom. Symp. **218** (2004) 157-164.

17. X. Shuai, Y. He, Y-H. Na, Y. Inoue, J. Appl. Polym. Sci. **80** (2001) 2600-2608, doi: <https://doi.org/10.1002/app.1371>
18. J. Li, T. Fukuoka, Y. He, H. Uyama, S. Kobayashu, Y. Inoue, J. Appl. Polym. Sci. **97** (2005) 2439-2449, doi: <https://doi.org/10.1002/app.22004>
19. S. Jose, A. S. Aprem, B. Francis, M. C. Chandy, P. Werner, A. Alstaedt, S. Thomas, Europ. Polym. J. **40** (2004) 2105-2115, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.02.026>
20. A. El Hadi, R. Schnabel, E. Straube, G. Müller, S. Henning, Polym. Test. **21** (2002) 665-674, doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(01\)00142-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(01)00142-8)
21. D. N. Bikiaris, G. Z. Papageorgiou, E. Pavlidou, N. Vouroutzis, P. Palatzoglou, G. P. Karayannidis, J. Appl. Polym. Sci. **100** (2006) 2684-2696, doi: <https://doi.org/10.1002/app.22849>
22. URL:<https://www.slideshare.net/shanthanukgowda/phb-production-by-bacteria-and-its-applications> (29.9.2022.)
23. URL:[https://turkish.alibaba.com/product-detail/Quality-products-DIOCTYL-PHTHALATE-99-Plasticizer-62024351006.html#https://www.fagron.hr/product/image/medium/1001457\\_1.jpg,http://vn.fengchengroup.net/Content/upload/2019213775/201903191451532190486.jpghttps://5.imimg.com/data5/UY/PD/MY-12445799/polyethylene-glycols-peg-500x500.jpg](https://turkish.alibaba.com/product-detail/Quality-products-DIOCTYL-PHTHALATE-99-Plasticizer-62024351006.html#https://www.fagron.hr/product/image/medium/1001457_1.jpg,http://vn.fengchengroup.net/Content/upload/2019213775/201903191451532190486.jpghttps://5.imimg.com/data5/UY/PD/MY-12445799/polyethylene-glycols-peg-500x500.jpg) (29.9.2022.)
24. D. Sinčić, Biodizel, Filedata, Zagreb, 2008, str.17-73.
25. T. Tadić, Proizvodnja lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* u cilju razvoja održivog procesa enzimske sinteze biodizela, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019, str. 5-6.
26. A. O. Thomas, M. C. Leahy, J. W. N. Smith, M. J. Spence, Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater, Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology **50** (2017) 301-317, doi: <https://doi.org/10.1144/qjegh2016-130>
27. D. Mowla, N. Rasti, P. Keshavarz, Transesterification of waste cooking oil for biodiesel production using modified clinoptilolite zeolite as a heterogeneous catalyst, World Academy of Science **9** (2016) 1201-1202, doi: [waset.org/Publication/10005458](http://waset.org/Publication/10005458)

28. *B. Andričić*, Vježbe iz biotehnoloških procesa, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2010, str. 22-23.
29. *M. Erceg*, Struktura i svojstva polimera-Priručnik za laboratorijske vježbe, Sveučilišni priručnik, Split, 2017, str. 83-85,  
<https://www.ktf.unist.hr/index.php/knjiznica-3/repozitorij-265> (12. 10. 2022.)
30. Pravilnik o jestivom ulju i mastima, NN 11/2019.
31. *M. Ramezani, M. A. Amoozegar, A. Veritosa*, Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1, *Annals Microbiology* **65**, 2015, 517-526, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-014-0887-y>
32. *S. Basumatary, D. C. DeKa*, Identification of fatty acid methyl esters in biodiesel from *Pithecellobium monadelphum* seed oil, *Der Chemica Sinica* **3**, 2012, 1384-1393.