

Proizvodnja kalcijeva klorida iz ljuske jaja

Peranović, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:764722>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Katarina Peranović

PROIZVODNJA KALCIJEVA KLORIDA IZ LJUSKE JAJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Biokemija

Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 24. lipnja 2021.

Mentor: prof. dr. sc. *Ivica Strelec*

Komentor: doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*

Pomoć pri izradi: *Marta Ostojčić*, mag. ing. proc., asistentica

Proizvodnja kalcijeva klorida iz ljuske jaja

Katarina Peranović, 0113142514

Sažetak:

Ovim se diplomskim radom htio proizvesti praškasti kalcijev klorid iz ljuske jaja primjenom kiselinske obrade ljuske jaja 5 % kloridnom kiselinom u šaržnom reaktoru volumena 15 L te slijednom proizvodnjom praškastog kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem. Pronađeno je da se proces cjelokupnog otapanja ljuske jaja uz 100 %-tni prinos na kalcijevu kloridu postiže tijekom 3 h i 30 minuta. Daljnjom obradom dobivenih otopina koja je uključivala neutralizaciju i flokulaciju te ugušćivanje postignuto je uklanjanje dijela organske tvari prisutne u ljusci jaja, čime su otopine kalcijeva klorida dodatno pročišćene. Primjenom postupka sušenja raspršivanjem ugušćenih otopina kalcijeva klorida pri optimalnim uvjetima (protok pumpe 5 %; protok zraka 30 L/min; temperatura sušenja 210 °C) dobivena je praškasta sol bezvodnog kalcijeva klorida visokog stupnja čistoće i zadovoljavajuće zdravstvene ispravnosti, pri čemu je prinos iznosio 88 % na masu vlažne ljuske jaja, odnosno 102 % na suhu tvar ljuske jaja.

Ključne riječi: *ljuska jaja, kiselinska obrada, kloridna kiselina, kalcijev klorid, sušenje raspršivanjem*

Rad sadrži: 42 stranica
6 slika
18 tablica
0 priloga
41 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

| | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i> | član-komentor |
| 4. prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 16. prosinca 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Biochemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 24, 2021.

Mentor: *Ivica Strelec*, PhD, prof.

Co-mentor: *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

Technical assistance: *Marta Ostojčić*, mag. ing. proc., assistant

Production of Calcium Chloride from Eggshells

Katarina Peranović, 0113142514

Summary

The possibility of the production of calcium chloride from eggshell waste in 15 L batch reactor, followed by spray drying of obtained calcium chloride solution was examined. In this respect eggshells were exposed to 5 % hydrochloric acid with complete transformation of eggshell calcium carbonate to calcium chloride (100 % yield) during 3 h 30 min. Further treatment of calcium chloride solution including neutralization and flocculation followed by evaporation to the 1/10 of volume yielded partially purified calcium chloride solution with reduced amount of organic matter. Spray drying of such prepared solution at optimal conditions (pump flow 5%; air flow 30 L / min; drying temperature 210 ° C) yielded anhydrous calcium chloride of high purity and satisfactory microbiological safety. Production yield of calcium chloride was 88 % per wet weight of eggshell waste, or 102 % per dry matter of eggshell waste.

Key words: *Eggshells, acid solubilization, hydrochloric acid, calcium chloride, spray drying*

Thesis contains: 42 pages
6 figures
18 tables
0 supplements
41 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|---------------|
| 1. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date: December 16, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. Ljuska jaja kao otpad | 2 |
| 2.2. Kemijski sastav ljuske jaja..... | 2 |
| 2.3. Mogućnosti uporabe ljuske jaja | 4 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 7 |
| 3.1. Zadatak..... | 7 |
| 3.2. Materijali i metode..... | 7 |
| 3.2.1. Uzorci..... | 7 |
| 3.2.2. Kemikalije i reagensi..... | 7 |
| 3.2.3. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja | 8 |
| 3.2.4. Proizvodnja otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja | 9 |
| 3.2.5. Priprema otopina kalcijeva klorida za sušenje raspršivanjem | 11 |
| 3.2.6. Sušenje raspršivanjem..... | 12 |
| 3.2.7. Određivanje koncentracije kalcija i kalcijevih soli kompleksometrijskom titracijom | 13 |
| 3.2.8. Određivanje koncentracije proteina | 14 |
| 3.2.9. Kemijska i fizikalno-kemijska karakterizacija proizvedenog kalcijeva klorida | 15 |
| 3.2.10. Mikrobiološka analiza proizvedenog kalcijeva klorida | 17 |
| 3.2.11. Statistička analiza podataka | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 20 |
| 4.1. Kemijski sastav ljuske jaja..... | 20 |
| 4.2. Proizvodnja kalcijeva klorida iz ljuske jaja..... | 22 |
| 4.3. Optimizacija uvjeta za proizvodnju praškastog kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem | 31 |
| 4.4. Sušenje raspršivanjem i prinosi kalcijeva klorida | 31 |
| 4.5. Karakterizacija proizvedenih praškastih soli kalcijeva klorida | 35 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 39 |
| 6. LITERATURA..... | 40 |

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

1. UVOD

Ljuska jaja kao otpad nastaje u različitim industrijama, ugostiteljskim objektima i kućanstvima, a predstavlja visokovrijednu sirovinu za proizvodnju različitih proizvoda dodane vrijednosti (Strelec i sur., 2021). Svrstava se u kategoriju opasnog otpada koji je potrebno na siguran način zbrinuti što podrazumijeva dodatna ulaganja i troškove. S druge strane, ljusku jaja karakterizira bogat kemijski sastav te se njenom pretvorbom u nove proizvode mogu postići velike ekonomske i ekološke prednosti (Mignardi i sur., 2020).

Bogat kemijski sastav ljuske jaja proizlazi iz strukture ljuske jaja koja se sastoji iz tri različita fizički odvojena dijela. Tako kalcificirani matriks, odnosno pravu ljusku jaja, karakterizira visok udio kalcijeva karbonata, membrana ljuske jaja sadrži visok udio proteina, od kojih prema Mittal i sur. (2016) kolagen čini 35 %, a prijanjajući sloj bjelanjka uz visok sadržaj vode sadrži i visokovrijedne proteine od kojih 54 % čini ovalbumin, 12 % ovotransferin, te 4 % lizozim (Strelec i sur., 2021; Zajec, 2020).

Soli nastale otapanjem ljuske jaja u odgovarajućoj kiselini imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji (Tomičić, 2020). S obzirom na visok udio kalcija u kalcificiranom matriksu, ovim diplomskim radom htjela se ispitati mogućnost proizvodnje kalcijeva klorida iz ljuske jaja kao otpada poljoprivredno-prehrambene industrije primjenom kloridne kiseline u šaržnom reaktoru volumena 15 L te slijednim sušenjem raspršivanjem.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ljuska jaja kao otpad

Ljuska kokošnjih jaja je otpad koji nastaje u poljoprivredno-prehrambenoj, biotehnološkoj te farmaceutskoj industriji, dok dio ljuske jaja nastaje u obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima i obrtima, restoranima i domaćinstvima. Na temelju saznanja da ljuska jaja čini 10-11 % ukupne mase jaja te podataka o ukupnoj masi proizvedenih jaja u svijetu procijenjeno je da je 2018. godine nastalo najmanje 7.894.962 t ljuske jaja kao otpada od čega 777.000 t u Europskoj uniji, te 4.715 t u Republici Hrvatskoj (Strelec i sur., 2021). Gospodarenje otpadom nastalim od ljuske jaja predstavlja veliki problem i izazov u prehrambenoj industriji, kako zbog širenja neugodnih mirisa i rasta patogenih mikroorganizama, tako i zbog visokih cijena odlagališta potrebnih za upravljanje ovom vrstom otpada. Prema propisima Europske unije ljuska jaja smatra se opasnim otpadom, te je nužno pronaći alternativne načine pretvaranja ljuske jaja u vrijedne materijale za daljnju primjenu. Nadalje, ljuska jaja predstavlja primjer specifičnog otpada u prehrambeno-prerađivačkoj industriji s korisnim komponentama koje se još uvijek pronalaze u otpadu. Transformacija ljuske jaja u visokovrijedne proizvode spriječila bi negativan utjecaj tog otpada na okoliš, a istovremeno bi se mogao ostvariti i određeni profit jer bi se smanjili troškovi potrebni za odlaganje otpada. Uz to, ono najvažnije, pogoni za preradu ljuske jaja ostvarili bi, ili bi se barem približili, „zero waste“ modelu s kojim bi se količina nastalog otpada svela na najmanju moguću mjeru (Arabhosseini i Faridi, 2018; FAO, 2020; Mignardi i sur., 2020; Strelac i sur., 2021).

2.2. Kemijski sastav ljuske jaja

Strukturno gledajući ljuska jaja se sastoji od tri fizički različita dijela: kalcificiranog matriksa, odnosno „prave ljuske jaja“, membrane ljuske jaja koja je vezana s unutrašnje strane kalcificiranog matriksa, te prjanjajućeg sloja bjelanjka koji ostaje prilijepljen na membranu ljuske nakon odvajanja bjelanjka i žumanjka od cjelovitog jaja. S druge strane, važno je napomenuti da se ljuska jaja zaostala nakon kuhanja jaja i izljevanja pilića u valionicama sastoji iz samo dva dijela, kalcificiranog matriksa i membrane ljuske jaja (Hincke i sur., 2012; Strelac i sur., 2021). Iako, ne postoje točni podatci o masenom udjelu pojedine strukturne komponente

ljuske jaja, prema istraživanjima o kemijskom sastavu ljuske jaja kao otpada Waltona i sur. (1973), Streleca i sur. (2021), Tomičić (2020) i Zajec (2020) procijenjeno je da kalcificirani matriks ljuske jaja čini između 70 i 80 % ukupne mase vlažne ljuske jaja dok na membranu i na prijanjajući sloj bjelanjka pojedinačno otpada 10 do 15 % ukupne mase.

Analiza kemijskog sastava ljuske jaja u većini istraživanja provedena je na ljusci jaja s koje je prijanjajući sloj bjelanjka uklonjen procesom ispiranja, a isprana ljuska sušena određeno vrijeme (Strelec i sur., 2021). Tako su Al-awwal i Ali (2011) pronašli da isprana i osušena ljuska jaja sadrži 95 % kalcijeva karbonata, dok se prema Waltonu i sur. (1973) udio kalcijeva karbonata na bazi suhe tvari kreće od 88 do 92 % za ljusku jaja bez uklonjenog prijanjajućeg sloja bjelanjka, a za ljusku jaja kojoj je prethodno uklonjen prijanjajući sloj bjelanjka od 89 do 94 %. Kako membrana ljuske jaja čini oko 3 % mase suhe tvari ljuske jaja (Zajec, 2020) jasno je da je udio kalcijeva karbonata u kalcificiranom matriksu još veći, odnosno kreće se u rasponu od 92 do 97 % (Strelec i sur., 2021). Nadalje, maseni udio proteina u ljusci jaja na bazi suhe tvari s prijanjajućim slojem bjelanjka prema Waltonu i sur. (1973) iznosi 7,56 %, dok je udio proteina u ljusci s koje je ispran sloj bjelanjka nešto niži, a kreće se u rasponu od 3,92 do 5,63 % (Walton i sur., 1973; Waheed i sur., 2019; Ray i sur., 2017). Kako membrana ljuske jaja čini oko 3 % ukupne mase ljuske, te sadrži oko 89 % proteina, a prijanjajući sloj bjelanjka čini između 1,61 i 2,41 % mase ljuske na bazi suhe tvari može se reći da je zastupljenost proteina u svakom od tri dijela ljuske jaja kao otpada podjednaka (Strelec i sur., 2021; Zajec, 2020; Walton i sur., 1973).

Kalcificirani matriks ljuske jaja izgrađen je najvećim dijelom od kalcijeva karbonata (od 92 do 97 %), dok ostatak čine proteini (2 do 5 %), kalcijev fosfat (1 %), magnezijev karbonat (1 %), lipidi, ugljikohidrati i elementi u tragovima (Tsai i sur., 2006; Hincke i sur., 2012; Mittal i sur., 2016; Arabhosseini i Faridi, 2018; Waheed i sur., 2019; Mignardi i sur., 2020). Kako je ranije navedeno, s unutrašnje strane kalcificiranog matriksa nalazi se membrana jaja koja se sastoji od tri dijela: vanjske, unutrašnje i granične membrane koje predstavljaju trodimenzionalnu mrežu unakrsno povezanih proteinskih vlakana uronjenih u smjesu glikozaminoglikana i proteoglikana (Baláž, 2014; Long i sur., 2005; Mittal i sur., 2016; Zajec, 2020). Prema Mittal i sur. (2016) oko 60 % mase membrane jaja čine proteini od kojih je kolagena 35 %, dok Baláž (2014) navodi da proteini čine 80 do 85 % ukupne mase membrane jaja od čega 10 % čine kolagenska vlakna, a ostatak proteini i glikoproteini iz čega je vidljivo kako je autor u

glikoproteinsku frakciju svrstao i glikozaminoglikane. Nadalje, udio vode u membrani ljuske jaja varira ovisno o načinu izdvajanja membrane od ostatka ljuske, odnosno radi li se o suhom ili mokrom postupku. Tako King'ori (2011) bilježi udio vode u membrani 1,5 %, dok Vlad (2009) i Zajec (2020) navode udio vode koji se kreće u rasponu od 3 do 9 %. Kemijski sastav prijanjajućeg sloja bjelanjka može se procijeniti na osnovi podataka o kemijskom sastavu bjelanjka koji sadrži 88 % vode, 11 % proteina, a u preostalih 1 % ulaze lipidi, ugljikohidrati i mineralne tvari. Od proteina 54 % čini ovalbumin, 12 % ovotransferin, te 4 % lizozim pa se shodno tome može očekivati i da prijanjajući sloj bjelanjka ljuske jaja sadrži podjednaku količinu navedenih proteina (Strelec i sur., 2021), što je u svom diplomskom dokazao Zajec (2020).

2.3. Mogućnosti uporabe ljuske jaja

Mogućnost uporabe ljuske jaja kao otpada je široka i propisana nizom zakonskih akata i podakata, uputa, smjernica i preporuka. Neke od njih su Uredba (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi (EZ, 2009.), te Uredba Komisije (EU) br. 142/2011 o provedbi Uredbe (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi (EU, 2011.).

U dostupnoj literaturi navedene su različite mogućnosti uporabe ljuske jaja, odnosno transformacije ljuske u nove proizvode: transformacija ljuske u hranu za životinje, sirovina za biopliniska postrojenja, kemikalije, aditive, dodatke prehrani, farmaceutske, nutritivne i veterinarsko-medicinske proizvode, enzime ili različite funkcionalne materijale. Nadalje, ljuska jaja može se koristiti kao katalizator u proizvodnji biodizela, kao adsorbens u postupcima pročišćavanja otpadnih voda gdje se koristi kao zamjena za aktivni ugljen, te kao gnojivo jer zbog svog sastava (visokog sadržaja kalcija i dušika) omogućuje korekciju pH vrijednosti tla (Arabhosseini i Faridi, 2018; Strelac i sur., 2021). Nadalje, proizvodnja visokovrijednih proizvoda često zahtijeva alternativne metode obrade ljuske jaja jer je vrlo važno proizvesti siguran i zdravstveno ispravan proizvod kako za ljude tako i za životinje. Tako se, na primjer, ljuska jaja namijenjena korištenju za proizvodnju stočne hrane prethodno obrađuje na temperaturi od 80 °C kako bi se smanjila mikrobiološka kontaminacija. S druge strane, ljuska jaja se opisuje kao vjerojatno najbolji izvor prirodnog kalcija pa ne čudi činjenica kako je veliki broj istraživanja usmjeren u njenu transformaciju u proizvode namijenjene za ljudsku upotrebu,

kako u medicini tako i u prehrani. Na temelju istraživanja provedenih u svrhu utjecaja praha ljuske jaja na kosti, zaključeno je kako isti povećava mineralnu gustoću kostiju kod ljudi i životinja s osteoporozom (King'ori, 2011; Arabhosseini i Faridi, 2018; Strelec i sur., 2021).

Ljusku jaja nastalu u tvornicama za preradu jaja, na farmama i u ugostiteljskim objektima moguće je transformirati u tri različita proizvoda: bjelanjak ili otopinu proteina bjelanjka, membranu jaja, te kalcificirani matriks ljuske jaja (Strelec i sur., 2021). Već je ranije spomenut i opisan bogat i vrijedan sastav prijanjajućeg sloja bjelanjka, ali i činjenica da se u istraživanjima ljuske jaja ta komponenta najčešće ispire i zanemaruje. Prijanjajući sloj bjelanjka moguće je odvojiti centrifugalnom separacijom (Walton i sur., 1973) ili ispiranjem vodom kako su to opisali Tomičić (2020) i Zajec (2020), a što ujedno predstavlja i bolji način izdvajanja proteina bjelanjka (Strelec i sur., 2021). Kako nastala otopina proteina bjelanjka sadrži visoki udio vode i bogat hranjivi sastav javlja se problem mikrobiološke kontaminacije medija pa je potrebno odmah primijeniti određene postupke u svrhu zaštite od daljnjeg razvoja mikroorganizama. Kao najpogodnija metoda ističe se slijedna filtracija otopine kroz seriju od 3 do 4 filtra različitih veličina pora (od 34 do 0,22 μm) pri čemu bi se mogla dobiti sterilna otopina proteina bjelanjka (Strelec i sur., 2021). Na taj način sačuvali bi se visokovrijedni proteini poput ovalbumina, ovotransferina i lizozima, a čija cijena na tržištu doseže visoke vrijednosti (Strelec i sur., 2021). Nakon primarne obrade prijanjajućeg sloja bjelanjka jaja moguće je proizvesti hranu za životinje, a dodatnim postupcima obrade koji će osigurati dodatnu zdravstvenu ispravnost i sigurnost, moguće ga je koristiti kao sirovinu u prehrambenoj industriji ili za proizvodnju dodataka prehrani. Nadalje, u farmaceutskoj i biotehnološkoj industriji otopina prijanjajućeg sloja bjelanjka bi mogla poslužiti za proizvodnju pročišćenih visokovrijednih proteina (Strelec i sur., 2021).

S druge strane, o čemu ovaj diplomski rad jednim dijelom i govori, jest transformacija kalcificiranog matriksa ljuske jaja sub-transformacijskim postupkom odjeljivanja membrane jaja od kalcificiranog matriksa uz pomoć kiselinske obrade. Na taj se način kalcijev karbonat prisutan u kalcificiranom matriksu otapa i nastaje odgovarajuća kalcijeva sol i ugljikov dioksid, a nakon reakcije zaostaju membrane koje su gotovo kemijski nepromijenjene (Torres-Mansilla i Delgado-Mejía, 2017; Zajec, 2020) te imaju velik potencijal za daljnje korištenje. Soli nastale otapanjem kalcijeva karbonata u odgovarajućoj kiselini imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Tako se kalcijev klorid koristi kao aditiv pod brojem **E509** koji služi kao zgušnjiva

vač, učvršćivač, konzervans, stabilizator, sredstvo za kiseljenje, te kao adsorbens vlage zbog svojih higroskopnih svojstava (Tomičić, 2020). Njegova najčešća primjena je u industriji proizvodnje flaširane vode gdje se dodaje kao elektrolit, u mljekarskoj industriji gdje pospješuje aktivnost sirišta, ubrzava koagulaciju, a povećanjem kiselosti mlijeka povećava i čvrstoću skute. U industriji proizvodnje piva dodatkom kalcijeva klorida pospješuje se aktivnost α -amilaze i kvasaca. U salamurama kalcijev klorid može zamijeniti natrijev klorid i na taj način osigurati slan okus bez povećanja koncentracije natrija u organizmu unosom ukiseljene hrane. Prskanje voća i povrća otopinom kalcijeva klorida nakon berbe čuva svježinu, inhibira razvoj patogenih mikroorganizama, odgađa gubitak vitamina C, te produžuje trajnost voća i povrća (Martin-Diana i sur., 2007; Food Additives, 2020; Tomičić, 2020). Idući primjer je kalcijev acetat, aditiv pod brojem **E263**. Slično kao i kalcijev klorid koristi se kao stabilizator, konzervans, regulator kiselosti, a zbog svojih bakteriostatskih svojstava učinkovit je u održavanju svježine sirovog voća i povrća što su potvrdili Thakur i sur. (2019). U pekarstvu služi kao konzervans za inhibiciju rasta plijesni i bakterija (FAO, 2019; Food Additives, 2020; Tomičić, 2020). Nadalje, još jedna značajna skupina prehrambenih aditiva su kalcijevi fosfati koji predstavljaju široku skupinu različitih oblika kalcijeva fosfata. Prvi u nizu je kalcijev dihidrogenfosfat pod brojem **E450(vii)** koji se uz svojstva regulatora kiselosti i emulgatora koristi još kao tvar za sprječavanje isušivanja namirnica te kao stabilizator strukture i boje. Jednaka svojstva posjeduju i kalcijev polifosfat, aditiv pod brojem **E452(vi)**, odnosno kalcijev dihidrogen fosfat označen pod brojem **E341(i)**. Kalcijev dihidrogen fosfat se uz gore navedeno može koristiti i kao *učvršćivač*, odnosno sredstvo za poboljšanje strukture hrane, te kao *zgušnjivač*, sredstvo za postizanje određene gustoće namirnice (FAO, 1992; EU, 2012; Tomičić, 2020).

Nadalje, kalcificirani matriks može se iskoristiti za proizvodnju cementa, tekućih i praškastih gnojiva, te za proizvodnju bioplastike (Tan i sur., 2018; Shiferaw i sur., 2019; Owuamanam i Cree, 2020).

Membrana jaja zbog svog sastava predstavlja najvrjedniju komponentu ljuske jaja. Osim kolagena, u njenom sastavu se nalazi još hijaluronska kiselina te kondroitin sulfat, pa ne čudi da je zabilježen pozitivan učinak membrane jaja na zdravlje zglobova i vezivnih tkiva. Upravo zbog toga najčešći oblik u koji se prevode membrane su dodatci prehrani, a uvelike se primjenjuju u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji koje iz membrana izoliraju ranije navedene bioaktivne komponente (Strelec i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Cilj je ovog diplomskog rada bio proizvesti praškasti kalcijev klorid iz ljuske jaja primjenom kiselinske obrade ljuske jaja kloridnom kiselinom te slijednom proizvodnjom praškastog kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem. Pri tome je proizvodnju praškastog kalcijeva klorida bilo potrebno optimizirati obzirom na odabrane parametre sušenja raspršivanjem (protok pumpe, protok zraka), a po definiranju optimalnih uvjeta, dobivene praškaste soli kalcijeva klorida analizirati na kemijski sastav i svojstva sukladno zahtjevima za čistoću aditiva te mikrobiološku ispravnost. U konačnici, procijenjen je prinos proizvedenih praškastih soli kalcijeva klorida.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Uzorci

Ljuska kokošnjih jaja prikupljena je iz kućanstava i lokalnog restorana te čuvana pri -20°C do uporabe za pripremu kalcijeva klorida.

3.2.2. Kemikalije i reagensi

Za pripremu u 5 % otopine kloridne kiseline korištena je 37 % kloridna kiselina proizvođača Carlo Erba (Francuska). Višak kloridne kiseline u vodenoj otopini kalcijeva klorida neutraliziran je kalcijevim hidroksidom proizvođača Acros Organics (Španjolska). Za određivanje udjela kalcija korištena je kloridna kiselina (Carlo Erba, Francuska), natrijev hidroksid tvrtke T.T.T (Hrvatska), *di*-natrijeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline tvrtke Fischer Scientific (Ujedinjeno Kraljevstvo) te kalkon-karboksilna kiselina tvrtke Acros Organics (Sjedinjene Američke Države). Koncentracija proteina određivana je primjenom Bradfordičinog reagensa tvrtke Bio-Rad (Njemačka). Prilikom određivanja amino-šećera u otopinama soli Morgan-Elson-ovom metodom korištena je kloridna kiselina (Carlo Erba, Francuska), 2,4-pentadion tvrtke Acros Organics (Kina), *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldehid tvrtke Acros Organics (Indija), apsolutni etanol tvrtke Gram-mol (Hrvatska), ledena octena

kiselina i glukuronska kiselina tvrtke Acros Organics (Slovačka), glukozamin hidroklorid, 2-acetamino-2-deoksi-D-glukopiranoza, galaktozamin hidroklorid te *N*-acetil-D-galaktozamin tvrtke Acros Organics (Kina). Za određivanje proteina metodom po Kjeldahl-u korišten je natrijev sulfat tvrtke Lach-Ner (Češka), bakrov (II) sulfat pentahidrat tvrtke Gram mol (Hrvatska), koncentrirana sumporna kiselina tvrtka Carlo Erba (Francuska) te laboratorijski pripremljen Tashirov reagens. Nadalje prilikom određivanja ukupnih lipida po Folch-u korišten je kloroform tvrtke Carlo Erba (Francuska), metanol tvrtke Kefo (Slovenija) te natrijev klorid tvrtke Gram mol (Hrvatska).

3.2.3. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja

Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja uključivalo je određivanje: a) udjela suhe tvari, b) ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u, c) ukupnih lipida metodom po Folsch-u, d) udjela kalcijeva karbonata kompleksometrijskom titracijom, te e) udjela pepela.

Određivanje udjela suhe tvari. Određivanje udjela suhe tvari u ishodnoj (*ljuska jaja prikupljena kao otpad*) i ispranoj ljuski jaja (*ljuska jaja isprana vodom*), kao i proizvedenim solima provedeno je metodom po Tomičić (2020). U prethodno osušene i izvagane aluminijske posudice dodano je oko 2,5 g ljuske jaja ili proizvedenih soli te je sušenje do konstantne mase provedeno tijekom 24 sata pri 100 °C za ljusku jaja, a 4 h pri 105 °C u slučaju proizvedenih soli.

Određivanje ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u. Određivanje ukupnih proteina (*tzv. sirovih bjelančevina*) po Kjeldahl-u ljusci jaja je provedeno prema Primorac i Flanjak (2012). Masi od 0,2 g samljevenih uzoraka ljuske jaja u epruveti za spaljivanje dodano je 0,0025 g modre galice kao katalizatora, 2,5 g natrijeva sulfata kao agensa za povišenje vrelišta, 3,75 mL koncentrirane sumporne kiseline, te su uzorci postavljeni u blok za spaljivanje Behr Labor-Tecnik Behrotest K12 (Njemačka) pri 420 °C tijekom jednog sata. Spaljenim uzorcima u epruvetama, ohlađenim na sobnu temperaturu, dodano je 70 mL destilirane vode te su epruvete postavljene u aparat za destilaciju Gerhard, Vapodest 1 (Njemačka). Prije destilacije uzorcima u epruvetama dodano je 50 mL 35 % vodene otopine natrijeva hidroksida, a destilat je prikupljan u Erlenmeyerove tikvice koje su sadržavale 25 mL 0,01 M kloridne kiseline i nekoliko kapi Tashiro indikatora. Pri tome je prikupljeni volumen destilata u Erlenmeyerovoj tikvici iznosio oko 100 mL. Otopine su titrirane sa 0,01 M natrijevim

hidroksidom do promjene boje iz ružičaste u zelenu. Na osnovi volumena 0,01 M natrijeva hidroksida utrošenog za neutralizaciju izračunata je količina dušika u uzorku. Udio ukupnih (*sirovih*) proteina u ljuski jaja izražen je u %-tku množenjem količine dobivenog dušika sa faktorom 6,25.

Određivanje ukupnih lipida po Folsch-u. Udio ukupnih lipida po Folsch-u određen je prema Folch i sur. (1975). U plastičnu epruvetu konusnog dna volumena 50 mL odvagano je 1 g ljuske jaja, uzorku je dodano 20 mL smjese kloroform-metanol u omjeru 2:1, i suspenzija je postavljena na miješanje na orbitalnu tresilicu IKA KS 260 basic pri 400 okretaja/min tijekom 20 minuta. Po završetku miješanja (*ekstrakcije lipida*) suspenzija je izbistrena centrifugiranjem tvrtke Hermle Labortechnik tip Z 206 A (Njemačka) pri 2000 okretaja/min tijekom 20 minuta, nakon čega je dobiveni supernatant profiltriran kroz nabrani filter papir. Filtratu je potom dodano 4 mL 0,9 % otopine natrijeva klorida u svrhu razdvajanja slojeva, nakon čega je gornji sloj izdvojen, a donji kvantitativno prenesen u prethodno osušene i izvagane tikvice za uparavanje. Proces uparavanja proveden je na rotacijskom uparivaču Vacuum Controller V-800 tvrtke Büchi (Švicarska) pri 60 °C i 150 okretaja/min, nakon čega je suhi ostatak sušen do konstante mase pri 105 °C.

Određivanje udjela kalcijeva karbonata kompleksometrijskom titracijom. Udio kalcijeva karbonata u ljuski jaja određen je kompleksometrijskom titracijom prema Tomičić (2020).

Određivanje udjela pepela. Određivanje udjela pepela u ljuski jaja provedeno je prema Al-awwal i Ali (2015) pri 650 °C. U prethodno pripremljene i izvagane lončice za žarenje izvagano je oko 0,2 g i uzorci su potom karbonizirani na električnom grijaču do pojave bijelog dima. Nakon toga, su karbonizirani uzorci postavljeni na žarenje u mufolnu peć Iskraterm tip 1 (Iskraterm, Slovenija) pri 650 °C tijekom jednog sata i 30 minuta.

3.2.4. Proizvodnja otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja

Proizvodnja otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja provodila se u tri koraka. Ljuska jaja je prvo isprana vodovodnom vodom u svrhu uklanjanja nečistoća i pranjajućeg sloja bjelanjka, da bi potom isprana ljuska jaja bila podvrgnuta djelovanju 5 % (*w/v*) kloridne kiseline u svrhu otapanja kalcijeva karbonata ljuske, odnosno nastajanja kalcijeva klorida. U trećem koraku je otopina kalcijeva klorida podvrgnuta višestrukoj filtraciji kako bi se uklonile zaostale nečistoće.

Ispiranje ljuske jaja. U šaržnom reaktoru (**Slika 1**) maksimalnog volumena od 15 L, masi od 650 g ljuske jaja dodano je 6,5 L vodovodne vode i postupak ispiranja ljuske jaja uz konstantno miješanje pri 350 okretaja/min proveden je 3×10 minuta uz izmjenu vode nakon svakog ispiranja. Pri tome je potrebno napomenuti da je u preliminarnim istraživanjima proces ispiranja ljuske jaja proveden 3×15 minuta uz izmjenu vode nakon svakog ispiranja.



Slika 1 Šaržni reaktor za ispiranje i kiselinsku obradu ljuske jaja

Kiselinska obrada ljuske jaja. Ispranoj ljusci jaja u šaržnom reaktoru volumena od 15 L dodano je 10 L 5 % (w/v) kloridne kiseline, pri čemu je proces dodavanja kiseline proveden u manjim obrocima uz varijabilni broj obrtaja miješaćeg tijela, a sve u svrhu kako bi se smanjio nastanak pjene uzrokovan stvaranjem mjehurića ugljikova dioksida prilikom reakcije otapanja kalcijeva karbonata. Pri tome je ključno za naglasiti da je odnos molova kalcijevog karbonata ljuske jaja i kloridne kiseline iznosio 1:2,55. Proces dodavanja kiseline i regulacije broja obrtaja miješaćeg tijela proveden je kako slijedi. Na samom početku procesa dodana je jedna litra 5 % (w/v) HCl nakon čega je svakih 5 do 10 minuta ovisno o razini nastale pjene, dodavano po 0,5 L kiseline. Prije dodatka kiseline miješanje otopine je bilo prekinuto, a po dodatku miješanje je nastavljeno pri 150 okretaja/min, uz povremenu promjenu smjera vrtnje miješala, da bi se nakon 5-10 min miješanja broj okretaja povisio na 250 okretaja/min. Potpuno otapanje kalcijeva karbonata ljuske jaja postignuto je nakon 3 sata i 30 minuta.

Filtracija proizvedenih otopina kalcijeva klorida. Nakon potpunog otapanja ljuske jaja u šaržnom reaktoru, otopina kalcijevog klorida odvojena je od membrana jaja propuštanjem kroz plastičnu mrežicu veličina pora 0,5 mm, i potom podvrgnuta dodatnom odvajanju nečistoća primjenom dvostupanjske vakuum filtracije. U prvom koraku vakuum filtracije otopina kalcijeva klorida je filtrirana kroz nabrani filter papir Wathman 113 veličine pora 30 μm (Tisch Scientific, Sjedinjene Američke Države), da bi potom dobiveni filtrat bio dodatno filtriran kroz glatki filter papir Macherey-Nagel veličine pora 10 μm (Macherey-Nagel, Njemačka).

3.2.5. Priprema otopina kalcijeva klorida za sušenje raspršivanjem

Priprema otopina kalcijeva klorida za sušenje raspršivanjem uključivala je nekoliko koraka: a) neutralizaciju suviška kloridne kiseline kalcijevim hidroksidom uz istovremeno taloženje organske tvari, b) filtraciju, c) koncentriranje filtrata uparavanjem i slijednu d) filtraciju.

Neutralizacija suviška kiseline. Suvišak kloridne kiseline zaostao nakon potpunog otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja, neutraliziran je dodavanjem praškastog kalcijeva hidroksida filtratu otopina soli. Filtriranoj otopini kalcijeva klorida postepeno je dodavan praškasti kalcijev hidroksid uz miješanje na elektromagnetskoj miješalici (500 okretaja/min), sve dok otopina nije poprimila vrijednost $\text{pH} = 10$. Potom je otopina uz konstantno miješanje ostavljena stajati 30 minuta u svrhu flokulacije organske tvari i teških metala, da bi nakon toga bila provedena neutralizacija otopine do $\text{pH} = 7$ dodavanjem 2 M kloridne kiseline. Potom je otopina ostavljena stajati 15 minuta.

Filtracija. Neutralizirana otopina kalcijeva klorida filtrirana je kroz glatki filter papir Macherey-Nagel veličine pora 10 μm vakuum filtracijom, a dobiveni filtrat kalcijeva klorida korišten je za uparavanje.

Uparavanje. Uparavanje filtrirane otopine kalcijeva klorida provođeno je na 1/10 volumena u aparaturi za uparavanje koja se sastojala od grijače ploče, spremnika od nehrđajućeg čelika volumena 15 L te sonde za mjerenje temperature spojene s digitalnim regulatorom temperature (**Slika 2**). Prije početka procesa uparavanja u spremnik je dodano nekoliko staklenih kuglica za vrenje, a potom prethodno neutralizirana i filtrirana otopina kalcijeva klorida. Postupak uparavanja odvijao se na temperaturi od 120 °C do 150 °C, a trajao je oko 5 sati, odnosno sve dok nije postignut volumen od 1/10 početnog volumena otopine.



Slika 2 Aparatura za uparavanje kalcijeva klorida

Filtracija. Na sobnu temperaturu ohlađena uparena otopina kalcijeva klorida dodatno je pročišćena vakuum filtracijom kroz glatki filter papir Macherey-Nagel veličine pora 10 μm , a dobiveni filtrat korišten je za sušenje raspršivanjem.

3.2.6. Sušenje raspršivanjem

Proizvodnja praškastog kalcijeva klorida iz koncentriranih otopina provedena je na uređaju Mini Spray Dryer B-290 (**Slika 3**) tvrtke Büchi (Švicarska) pri optimalnim uvjetima (*određeni u preliminarnim istraživanjima*) kako slijedi: a) ulazna temperatura zraka za sušenje 210 °C, b) protok zraka na sapnici 30 L/min, c) aspirator 100 %, te d) protok pumpe 5 %. Sam proces optimizacije uvjeta sušenja raspršivanjem u preliminarnim istraživanjima uključivao je varijacije u protoku zraka na sapnici (20-30 L/min) te protok pumpe (5-20 %).



Slika 3 Uređaj za sušenje raspršivanjem Mini Spray Dryer B-290

3.2.7. Određivanje koncentracije kalcija i kalcijevih soli kompleksometrijskom titracijom

Određivanje koncentracije kalcija i/ili kalcijevih soli provedeno je kompleksometrijskom titracijom pomoću 25 mM *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline u prisutnosti kalkan-karboksilne kiseline kao indikatora (Tomičić, 2020.). Sam postupak određivanja se razlikovao obzirom na vrstu upotrijebljenog materijala koji se koristio u analizi, odnosno ovisio je o tome radi li se o praškastoj soli i/ili ljusci jaja ili o otopinama.

Tako je u slučaju praškastih kalcijevih soli i/ili ljuske jaja, masi od 0,5 g uzorka izvaganoj u staklenu čašu volumena 50 mL dodano 20 mL 2 M kloridne kiseline, pri čemu je postupak potpunog otapanja proveden miješanjem na elektromagnetskoj miješalici Mix 1 (2Mag, Njemačka) uz 500 okretaja/min. Nakon otapanja, otopini je podešena pH vrijednost na pH = 7 dodatkom kloridne kiseline i potom je uzorak kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, koja je nadopunjena do crte destiliranom vodom. Iz ovako pripremljenog uzorka izuzet je alikvot volumena 10 mL, koji je prebačen u Erlenmeyerovu tikvicu volumena

250 mL, te mu je dodano 40 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijeva hidroksida. Smjesa je ostavljena stajati 5 minuta u svrhu taloženja magnezijeva hidroksida, potom je smjesi dodano 250 μ L 0,1 % vodene otopine kalcij-karboksilne kiseline, nakon čega je uslijedila titracija 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promijene boje iz ljubičaste u plavu.

U slučaju otopina kalcijeva klorida, alikvotu volumena 0,5 mL u Erlenmyerovoj tikvici volumena 250 mL dodano je 49,5 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijeva hidroksida. Smjesa je ostavljena stajati 5 minuta u svrhu taloženja magnezijeva hidroksida, a potom je smjesi dodano 250 μ L 0,1 % vodene otopine kalcij-karboksilne kiseline, nakon čega je uslijedila titracija 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promijene boje iz ljubičaste u plavu. Kada su za analizu korištene koncentrirane otopine kalcijeva klorida, izdvojeni uzorak je prvo razrijeđen 10 puta, nakon čega je uslijedilo određivanje na gore opisan način.

Sve analize provedene su u tri (3) neovisna pokusa, od kojih svaki najmanje u 3 paralele.

3.2.8. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina Bradfordičinom metodom provedeno je u vodenim otopinama nakon ispiranja ljuske jaja vodom, otopinama nakon otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja 5 % (w/v) kloridnom kiselinom, te filtratima nakon provedene filtracije, neutralizacije i uparavanja otopine soli te isto tako u 10 % (m/V) otopinama proizvedenih praškastih soli. Metoda određivanja koncentracije proteina Bradfordičinom metodom temelji se na interakciji anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 s bazičnim i aromatskim bočnim ograncima u proteinima pri čemu nastaje kompleks protein boja, s maksimumom apsorbancije pri 595 nm (Bradford, 1976.).

Postupak određivanja sastojao se od sljedećeg: u kivetu sa 100 μ L uzorka dodano je 2 mL Bradfordičinog reagensa nakon čega je smjesa ostavljena stajati 5 minuta u svrhu razvitka boje. Na spektrofotometru Helios γ Termospectronic (Ujedinjeno Kraljevstvo) određen je intenzitet apsorbancije pri 595 nm uz slijepu probu koja se sastojala od 100 μ L destilirane vode i 2 mL Bradfordičinog reagensa. Na temelju baždarnog dijagrama pripremljenog sa poznatim koncentracijama goveđeg serumskog albumina vrijednosti apsorbancije preračunate su u masenu koncentraciju proteina u uzorcima.

3.2.9. Kemijska i fizikalno-kemijska karakterizacija proizvedenog kalcijeva klorida

Kemijska i fizikalno-kemijska karakterizacija proizvedenih praškastih kalcijevih soli uključivala je: a) određivanje pH vrijednosti 10 %-nih otopina soli, b) topljivost soli, c) udio suhe tvari, d) udio kalcijeva klorida, e) udio topljivih proteina u 10 %-nim otopinama soli, f) udio ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u, e) udio slobodnih alkalija, f) udio amino-šećera te g) procjenu čistoće i vrste proizvedene soli infracrvenom spektrofotometrijom (FTIR-ATR).

pH otopina soli. Vodenoj otopini 10 % (w/v) praškastog kalcijeva klorida određena je pH vrijednost mjerenjem pomoću pH metra HI 2020 Edge (Hana Instruments, Sjedinjene Američke Države). Uz navedeno, izmjerene su i pH vrijednosti otopina komercijalno dostupnog bezvodnog kalcijeva klorida i kalcijeva klorida dihidrata, a sve u svrhu usporedbe sa proizvedenim praškastim solima.

Topljivost soli. Određivanje topljivosti proizvedenih soli kalcijeva klorida u vodi provedeno je prema postupku Domrongpokkaphan i Khemkhao (2017) pri čemu se masa soli kretala u rasponu od 0,2 do 1,4 g (*povećanje po 0,2 g*), dok je volumen destilirane vode iznosio 1 mL. Otapanje soli provođeno je miješanjem pomoću vortex miješalice, pri čemu je najduže vrijeme miješanja iznosilo 5 minuta kako je to propisano prema FAO (2006). Uz proizvedene soli kalcijeva klorida, na topljivost su ispitane i komercijalne soli kalcijeva klorida (*bezzvodni kalcijev klorid; kalcijev klorid dihidrat*), a sve u svrhu usporedbe.

Udio suhe tvari u proizvedenim solima određen je prema Primorac i Flanjak (2012). U prethodno osušene i izvagane aluminijske posudice dodano je oko 2,5 g uzorka praškaste soli kalcijeva klorida te je sušenje do konstantne mase provođeno tijekom 4 sata pri 105 °C.

Udio kalcijeva klorida u proizvedenim i osušnim solima određen je kompleksometrijskom titracijom na način opisan u poglavlju 3.2.7. za praškaste uzorke.

Udio topljivih proteina u proizvedenim i osušnim solima određen je Bradfordičinom metodom.

Udio ukupnih proteina u proizvedenim i osušnim solima određen je Kjeldahlovom metodom kako je to opisano u poglavlju 3.2.3.

Udio slobodnih alkalija u proizvedenim i osušenim solima određen je modifikacijom metode prema FAO (1992; 2006). Masi od 1 g uzorka soli dodano je 20 mL destilirane vode, te je otapanje soli provedeno miješanjem na elektromagnetskoj miješalici pri 500 obrtaja/min. Nakon otapanja otopini dodano 100 μ L fenoftaleina kao indikatora, a neutralizacija slobodnih alkalija provedena je postepenim dodavanjem 0,02 M kloridne kiseline pri čemu je boja otopine iz ljubičaste prešla u bezbojnu.

Udio amino-šećera određen je Morgan-Elson-ovom metodom prema Wrolstad i sur. (2005). Metoda se temelji na reakciji *N*-acetil i/ili amino-šećera oslobođenih zagrijavanjem u alkalnom mediju sa *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldehidom koji sa amino-šećerima u kiseloj otopini tvori kromogen ljubičaste boje.

Postupak određivanja amino-šećera proveden je na sljedeći način: u staklenu epruvetu s čepom dodano je 50 μ L otopine proizvedenog kalcijeva klorida ($\gamma = 100$ mg/mL), nakon čega je dodano 2 mL 2,4-pentadiona te su uzorci izmiješani na vortex miješalici. Tako pripremljeni uzorci kuhani su u vodenoj kupelji 1 sat pri 100 °C, a potom su ohlađeni na sobnu temperaturu te im je dodano 2 mL otopine Erlich-ovog reagensa 1 (530 mg *N,N*-dimetil-*p*-aminobenzaldehid otopljen u 20 mL etanola i 15 mL koncentrirane kloridne kiseline). Otopine su potom izmiješane na vortex miješalici, a intenzitet apsorbancije mjeren je pri 530 nm uz slijepu probu koja je sadržavala 50 μ L destilirane vode, 2 mL 2,4-pentadiona te 2 mL Erlichovog reagensa 1. Intenzitet apsorbancije preračunat je u masenu koncentraciju na temelju baždarnog dijagrama pripremljenog sa smjesom šećera ukupne masene koncentracije od 1 mg/mL pri čemu je masena koncentracija svakog od šećera u smjesi (glukozamin-hidroklorid, galaktozamin-hidroklorid, *N*-acetil-D-glukozamin, *N*-acetil-D-galaktozamin, glukuronska kiselina) iznosila 0,2 mg/mL.

Infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR) soli proizvedenog kalcijeva klorida, te komercijalno dostupnih soli bezvodnog kalcijeva klorida i kalcijeva klorida dihidrata provedena je na FTIR-ATR spektrofotometru Cary 630 (Agilent, Sjedinjene Američke Države). Postupak mjerenja sastojao se od nanošenja uzorka soli na kristal spektrometra prethodno prebrisan 95 % etanolom, nakon čega je uslijedilo spuštanje prese uređaja na uzorak kako bi uzorak bio pritisnut uz sami kristal, te krajnje snimanja intenziteta apsorbancije uzorka u rasponu valnih brojeva od 650 do 4000 cm^{-1} .

3.2.10. Mikrobiološka analiza proizvedenog kalcijeva klorida

Mikrobiološka analiza proizvedenog kalcijeva klorida provedena je sukladno zahtjevima za mikrobiološku ispravnost namirnica na bazi jaja (Vanderzant i Splittstoesser, 1992; Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011).

U uzorcima je provjeren broj/prisutnost sljedećih skupina mikroorganizama:

1. aerobne, mezofilne bakterije
2. aerobne, sporogene bakterije
3. aerobne, termofilne sporogene bakterije,
4. koliformne bakterije
5. *Escherichia coli*
6. bakterije roda *Salmonella*
7. *Staphylococcus aureus*
8. kvasci i plijesni

Aerobne mezofilne bakterije

Nakon odvage uzorka, pripremljeno je osnovno razrjeđenje u sterilnoj fiziološkoj otopini. Poslije homogenizacije mućkanjem od 15 minuta, inokulum je prenesen u sterilne petrijeve zdjelice u koje je ulivena podloga za bakterije (TGK agar, Tryptic yeast extract glucose agar, Liofilchem, Italija). Nakon inkubacije od 7 dana pri 28°C, prebrojane kolonije su preračunate na 1 g uzorka (CFU – colony forming units, broj živih stanica) prema jednadžbi (1).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen inokuluma}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad (1)$$

Aerobne sporogene i termofilne bakterije

Uzorak (osnovno razrjeđenje pripremljeno kao za aerobne mezofilne bakterije) je pasteuriziran u vodenoj kupelji 10 minuta pri 80 °C. Inokulum u zdjelicama je preliven TGK agarom i inkubiran 7 dana pri 28 °C za aerobne sporogene, a 3 dana pri 60 °C za aerobne termofilne bakterije. Nakon inkubacije, prebrojane kolonije su preračunate na 1 g uzorka prema jednadžbi (1).

Koliformne bakterije

Iz osnovnog razrjeđenja (kao kod aerobnim mezofilnih bakterija), inokulum je prenesen u zdjelicu, potom je ulivena podloga za koliformne bakterije VRBG agar (Violet red bile glucose

agar). Nakon skrutnjavanja, podloga je prelivena s još jednim slojem, cca 10 mL VRBG agara, radi postizanja fakultativno anaerobnih uvjeta. Poslije inkubacije od 24 sata pri 37 °C, prebrojane su sitne, crvene kolonije i njihov broj preračunat na 1 g uzorka prema jednadžbi (1).

Escherichia coli

Inokulum, nakon pripreme osnovnog razrjeđenja, je prenesen na TBX agar (Tryptone Bile kromogeni agar, Liofilchem, Italija) i razmazan sterilnim metalnim štapićem. Prisutnost bakterija vrste *Escherichia coli* (plavo-zelene kolonije) provjerena je nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C. Istovremeno, pored određivanja broja stanica *E. coli* u uzorku, uzorak je analiziran MPN metodom koja se koristi kada su u uzorcima prisutni mali brojevi stanica. Po 10 mL uzorka je preneseno u po 5 epruveta s ALPV i cjevčicom za plin (Andrade lactose peptone water, Liofilchem, Italija) i inkubirano pri 37 °C tijekom 24 sata. Pozitivan test se smatra pojava crvene boje podloge u epruveti i veći volumen plina u cjevčici; *E. coli* je koliformna bakterija koja fermentira laktozu do kiselina (promjena boje indikatora u crvenu) i plinova (sakupljaju se u cjevčici).

Bakterije roda *Salmonella*

Prisutnost ovih bakterija određena je odvagom uzorka u puferiranoj peptonskoj vodi (Liofilchem, Italija). Nakon inkubacije od 18 sati pri 37 °C, 0,1 mL uzorka je preneseno u 10 mL Rappaport-Vassiliadis bujona (Liofilchem, Italija) i inkubirano 24 sata pri 41,5 °C. Poslije inkubacije, mikrobiološka ušica uzgoja (10 µL), prenesena je na XLD agar (Xylose lysine deoxycholate agar, Liofilchem Italija). Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, provjerena je prisutnost bezbojnih/crnih kolonija.

Staphylococcus aureus

Iz pripremljenog osnovnog razrjeđenja (kao kod aerobnih mezofilnih bakterija), 0,1 mL inokuluma je preneseno na ploče BP agara (Baird-Parkerov agar, Liofilchem, Italija) i inkubirano 48 sati pri 37 °C. Bakterije *S. aureus* tvore sitne, crne kolonije, okružene sivo-bijelim prstenom i prozirnom zonom prosvijetljenog lecitina iz žumanjka.

Kvasci i plijesni

Objekte skupine gljiva (kvasci i plijesni) su istovremeno određene (iz osnovnog razrjeđenja) prenošenjem inokuluma u zdjelicu i ulijevanjem YGC agara (Yeast extract glucose chloramphenicol agar, Liofilchem, Italija). Kolonije kvasaca (glatke) i plijesni (baršunaste) su prebrojane nakon inkubacije od 5 dana pri 28 °C i njihov broj preračunat na 1 g uzorka prema jednadžbi (1).

3.2.11. Statistička analiza podataka

Srednje vrijednosti i standardne devijacije triplikatnih mjerenja i višestrukih neovisnih pokusa su izračunate primjenom programa Excel (Microsoft, Sjedinjene Američke Države).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj je ovog diplomskog rada bio proizvesti praškasti kalcijev klorid iz ljuske jaja primjenom kiselinske obrade ljuske jaja kloridnom kiselinom u šaržnom reaktoru volumena 15 L te slijednom proizvodnjom praškastog kalcijeva klorida iz pripremljenih otopina kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem na uređaju Mini Spray Dryer B-290. Proizvodnja otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja provedena na temelju podataka Tomičić (2020) i Zajec (2020), pri čemu je ključno za naglasiti da je proces proizvodnje otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja bilo potrebno dodatno optimizirati, budući su oba autora provela istraživanja u laboratorijskom mjerilu s 15 g ljuske jaja, dok je ovo istraživanje provedeno u uvećanom mjerilu sa 650 g ljuske jaja, što predstavlja uvećanje za 43 puta. Nadalje, za razliku od Tomičić (2020) pripremljeni koncentracije kalcijeva klorida su podvrgnuti procesu sušenja raspršivanjem. Sam proces sušenja raspršivanjem temeljen je na patentu US3433863 Bowdena i sur. (1969), pri čemu ga je nakon definiranja temperature sušenja (210 °C) bilo potrebno optimizirati obzirom na odabrane parametre sušenja raspršivanjem (protok pumpe, protok zraka). Po definiranju optimalnih uvjeta sušenja raspršivanjem, dobivene praškaste soli kalcijeva klorida analizirane su na kemijski sastav i svojstva sukladno zahtjevima za čistoću aditiva te mikrobiološku ispravnost, te je u konačnici procijenjen prinos proizvedenih praškastih soli kalcijeva klorida.

4.1. Kemijski sastav ljuske jaja

Kako bi se točno mogao procijeniti stvarni prinos dobivenih praškastih soli bilo je potrebno odrediti kemijski sastav ljuske jaja, odnosno udio kalcijeva karbonata. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja uključivalo je udio suhe tvari, ukupnih proteina, ukupnih lipida, kalcijeva karbonata i pepela, pri čemu su analizirane cjelokupna ljuska jaja prikupljena kao otpad te isprana i osušena ljuska jaja. Rezultati analize prikazani su u **Tablici 1**. Vidljivo je da ljuska jaja prikupljena kao otpad sadrži oko 90 % suhe tvari, u kojoj dominira kalcijev karbonat ($92,88 \pm 0,29$ g/100 g_{s.t.}), ukupni proteini čine oko 6,6 %, dok je udio ukupnih lipida neznatan i čini manje od 0,5 %. U ispranoj ljusci jaja koja je nakon ispiranja vodom sušena 24 h pri 60 °C udio suhe tvari iznosi 100 %, te ne iznenađuje činjenica da je udio kalcijeva

karbonata još viši i iznosi $93,71 \pm 0,90$ g/100 g_{s.t.}. S druge strane, udio proteina u ispranoj i osušenoj ljusci jaja je upola niži u odnosu cjelovitu ljusku jaja prikupljenu kao otpad i iznosi $3,87 \pm 0,24$ g/100 g_{s.t.}. Navedeno ne iznenađuje budući je poznato da ljuska jaja prikupljena kao otpad sadrži u svom sastavu i dio proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka koji se tijekom ispiranja vodom uklone sa iste (Strelec i sur. 2021; Zajec 2020; Walton i sur., 1973).

Tablica 1 Kemijski sastav ljuske jaja kao otpada^{*, **}

| Parametar | Cjelovita ljuska jaja ^{***} | Isprana ljuska jaja ^{****} |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Suha tvar [g/100 g ljuske jaja] | $90,18 \pm 0,77$ | $100 \pm 0,00$ |
| Proteini [g/100 g suhe tvari ljuske jaja] | $6,64 \pm 0,41$ | $3,87 \pm 0,24$ |
| Lipidi [g/100 g suhe tvari ljuske jaja] | $0,31 \pm 0,26$ | $0,62 \pm 0,21$ |
| Kalcijev karbonat [g/100 g suhe tvari ljuske jaja] | $92,88 \pm 0,29$ | $93,71 \pm 0,90$ |
| Pepeo [g/100 g suhe tvari ljuske jaja] | $52,30 \pm 0,39$ | $53,89 \pm 1,17$ |

* Ljuska jaja je prikupljena iz domaćinstava i restorana

** rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija najmanje pet (5) određivanja

*** cjelovita ljuska jaja podrazumijeva ljusku jaja prikupljenu iz domaćinstava i restorana

**** isprana ljuska jaja – ljuska jaja iz koje su izdvojeni proteini prijanjajućeg sloja bjelanjka ispiranjem 3×10 min i koja je potom osušena do konstantne mase

Usporede li se dobiveni podaci o udjelu kalcijeva karbonata, proteina i lipida u suhoj tvari ljuske jaja (**Tablica 1**) sa onima u dostupnoj literaturi, tada se može zaključiti da su oni relativno u suglasju sa istima. Tako Walton i sur. (1973) navode da udio kalcijeva karbonata u ljusci jaja prikupljenoj kao otpad iz industrije proizvodnje melanža jaja iznosi $90,90 \pm 1,00$ %, dok u vodom ispranoj ljusci jaja iznosi $93,10 \pm 0,20$ % što je poprilično u skladu sa dobivenim rezultatima u ovom diplomskom radu. S druge strane Tomičić (2020) navodi nešto niže vrijednosti za udio kalcijeva karbonata pri čemu u cjelovitoj i osušenoj ljusci jaja kao otpadu navodi vrijednost od $84,46 \pm 2,01$ g/100 g_{s.t.}, a ispranoj i osušenoj ljusci jaja od $88,69 \pm 1,68$ g/100 g_{s.t.}. Udio proteina prema Walton i sur. (1973) u cjelovitoj ljusci jaja iznosi $7,56 \pm 0,26$ %, a vodom ispranoj ljusci jaja $5,15 \pm 0,48$ % što je nešto više od rezultata dobivenih u ovom diplomskom radu. S druge strane i Ray i sur. (2017) te Waheed i sur. (2019) navode da se udio proteina u vodom ispranoj i osušenoj ljusci jaja kreće u rasponu od 3,92 do 5,04 % što je u skladu sa podacima dobivenim u ovom diplomskom radu. U usporedbi sa dostupnim literaturnim podacima udio lipida u ovom diplomskom radu je nešto viši. Tako Ray i sur. (2017) te Waheed i sur. (2019) navode da se udio lipida u vodom ispranoj i osušenoj ljusci

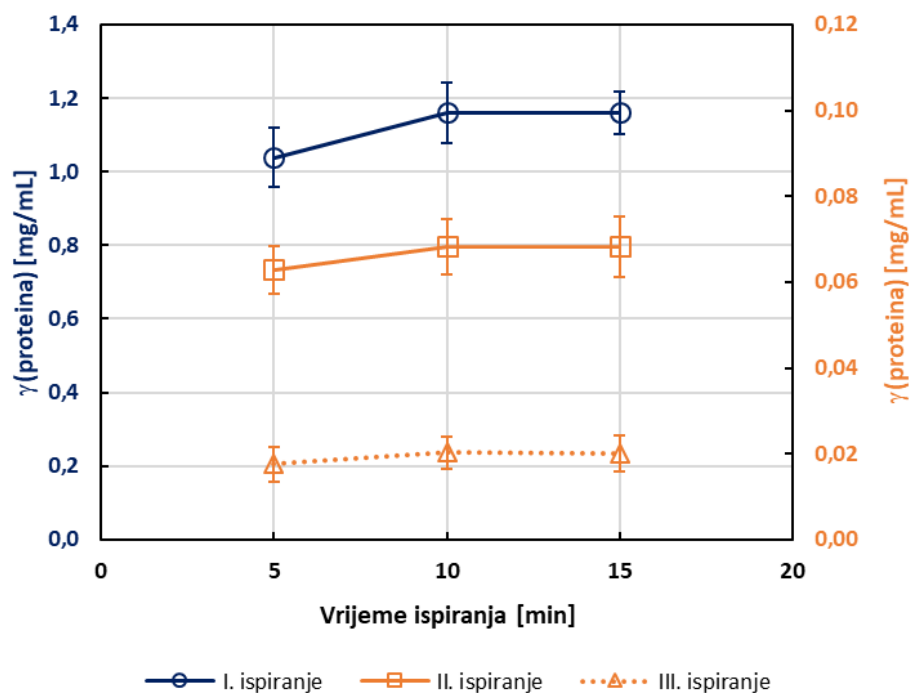
jaja kreće u rasponu od 0,08 do 0,35 %, dok Walton i sur. (1973) navode udio od svega 0,05 % za vodom ispranu ljusku jaja, te $0,24 \pm 0,14$ % za cjelovitu ljusku jaja prikupljenu kao otpad. Najvjerojatniji razlog tomu je metoda kojom su određivani ukupni lipidi.

Za razliku od gore navedenog udio suhe tvari i udio pepela u ljusci jaja poprilično se razlikuje od literaturno dostupnih podataka. Tako Walton i sur. (1973) navode da ljuska jaja prikupljena kao otpad sadrži $29,10 \pm 1,1$ % vode, odnosno $70,90 \pm 1,1$ % suhe tvari, dok Tomičić (2020) i Zajec (2020) navode da svježa ljuska jaja prikupljena kao otpad sadrži $78,81 \pm 0,54$ g suhe tvari. S druge strane prema Waltonu i sur. (1973) udio pepela u ljusci jaja iznosi $91,90 \pm 0,50$ % za cjelovitu ljusku jaja, odnosno $95,40 \pm 0,10$ % za ispranu ljusku jaja, dok Al-awwal i Ali (2013) navode udio pepela od 43,5 do 47,5 %. Ove razlike djelomično mogu biti rezultat različitog manipuliranja ljuskom jaja prije određivanja udjela suhe tvari, kao i primijenjene temperature žarenja prilikom određivanja udjela pepela.

4.2. Proizvodnja kalcijeva klorida iz ljuske jaja

Proizvodnja koncentriranih otopina kalcijeva klorida iz ljuske jaja uključivala je sljedeće korake: a) ispiranje ljuske jaja, b) kiselinska obrada ljuske jaja, c) filtracija, d) neutralizacija i flokulacija, e) filtracija, f) uparavanje te g) filtracija. Pri tome je bilo potrebno optimizirati određene korake proizvodnje u odnosu na Tomičić (2020), i to zbog uvećanja proizvodnog mjera (uvećanje $43 \times$) i primjene drugačije aparature.

Prvi korak optimizacije uključivao je vrijeme neophodno za ispiranje ljuske jaja od proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka. Naime, Tomičić (2020) je proces ispiranja provodila 3×30 minuta na orbitalnoj tresilici, dok je u ovom slučaju za ispiranje korišten 15 L šaržni reaktor sa miješačim tijelima, te je umjesto destilirane za ispiranje korištena vodovodna voda. Obzirom da se očekivalo da će se primjenom miješačih tijela postići znatno brže izdvajanje proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka, to se u preliminarnom istraživanju pratila koncentracija proteina u vodi svakih 5 minuta tijekom 15 minuta, a rezultati praćenja su prikazani **Slikom 4**. Vidljivo je da se maksimalno izdvajanje proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka iz ljuske jaja tijekom ispiranja u šaržnom reaktoru postiglo već nakon 10 minuta miješanja, pri čemu se najviše proteina izdvojilo u prvom ispiranju, a preostale količine u drugom i trećem ispiranju. Shodno dobivenim rezultatima proces ispiranja ljuske jaja vodovodnom vodom postavljen je na 3×10 minuta.



Slika 4 Utjecaj vremena miješanja na izdvajanje proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele.

U **Tablici 2** i na **Slici 5** prikazani su rezultati izdvajanja proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja sukladno uvjetima ispiranja ljuske jaja vodovodnom vodom, a koji su bili definirani preliminarnim istraživanjem (3 × 10 minuta).

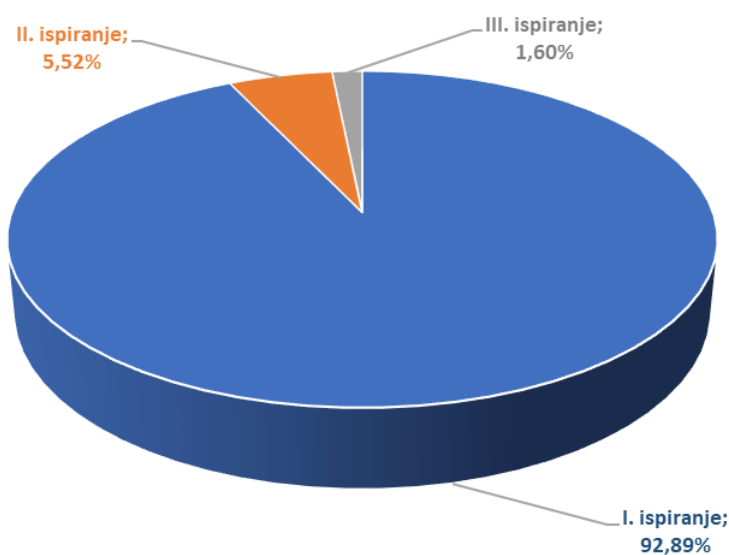
Tablica 2 Masena koncentracija, ukupna masa i udio proteina u vodi nakon ispiranja proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja^{*,**}

| Ispiranje | $\gamma(\text{proteini})$ [g/L] | $m(\text{proteini})$ [g] | $w(\text{proteini})^{***}$ [g/100 g s.t.] |
|----------------|---------------------------------|--------------------------|---|
| I. ispiranje | 1,120 ± 0,070 | 7,280 ± 0,457 | 1,242 ± 0,078 |
| II. ispiranje | 0,066 ± 0,003 | 0,432 ± 0,020 | 0,074 ± 0,003 |
| III. ispiranje | 0,019 ± 0,002 | 0,125 ± 0,010 | 0,021 ± 0,002 |
| Ukupno | | 7,837 ± 0,487 | 1,337 ± 0,083 |

* rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele

** koncentracija proteina je određena Bradfordičinom metodom

*** udio proteina izražen je na suhu tvar ljuske jaja



Slika 5 Udio izdvojenih proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja prema stupnju ispiranja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele.

Kako je to već i prije bilo navedeno, vidljivo je da se najveći dio proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka izdvajao tijekom prvog ispiranja. Tako se u prvom ispiranju u vodu prosječno izdvojilo 92,89 % od ukupno izdvojenih proteina, u drugom ispiranju 5,52 %, a trećem ispiranju svega 1,60 %, što je gotovo podjednako prethodno objavljenim podacima Zajeca (2020). Međutim, za razliku istraživanja Zajeca (2020) i Tomičić (2020) gdje se ispiranje provodilo 3×30 minuta potrebno je naglasiti da se u ovom diplomskom radu ispiranje ljuske jaja provodilo 3×10 minuta, što zapravo predstavlja znatnu uštedu vremena.

Sljedeći korak optimizacije u odnosu na Tomičić (2020) bio je kiselinska obrada ljuske jaja kloridnom kiselinom. Naime, dok je Tomičić (2020) ispranoj ljusci jaja odmah dodala cjelokupni volumen kiseline, preliminarni pokušaj otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja u cjelokupnom volumenu kloridne kiseline u 15 L šaržnom reaktoru pokazao se krajnje nepovoljnim, te je bilo potrebno podesiti postupak dodavanja kiseline, kao i brzinu vrtnje miješaćih tijela, a sve u svrhu sprječavanja prelijevanja nastale pjene iz reaktora. Stoga je dodavanje kiseline provedeno postepeno uz regulaciju miješanja i obrtanja smjera miješaćih tijela kako je to navedeno u eksperimentalnom dijelu (3.2.4.). Pri tome je za cjelokupno otapanje kalcijeva karbonata ljuske jaja bilo potrebno 3 h i 30 minuta, nakon kojeg je iz početnih 650 g vlažne ljuske jaja kao otpada dobiveno $606,88 \pm 10,54$ g kalcijeva klorida (**Tablica 3**).

Tablica 3 Masena koncentracija i ukupna masa kalcijeva klorida u otopinama dobivenim nakon obrade ljuske jaja 5 % otopinom kloridne kiseline *

| Uzorak | $\gamma(\text{CaCl}_2)$ [g/L] | $m(\text{CaCl}_2)$ [g] |
|---------|-------------------------------|------------------------|
| Otopina | 60,69 ± 1,05 | 606,88 ± 10,54 |

* masena koncentracija kalcijeva klorida u otopini određena je nakon slijedne filtracije otopine kroz filter papir Whatman 114 i Whatman 1

Kada se količina proizvedenog kalcijeva klorida iz ljuske jaja usporedila sa teorijski izračunatom masom kalcijeva klorida i to na osnovi podataka o kemijskom sastavu ljuske jaja (**Tablica 1**) tada se moglo zamijetiti da se primjenom navedenih uvjeta proizvodnje postiže 100 %-tna pretvorba kalcijeva karbonata ljuske jaja u kalcijev klorid (**Tablica 4**). Za razliku od toga, Tomičić (2020) je u svom istraživanju postigla nešto niži postotak pretvorbe od 92,76 ± 4,47 %.

Tablica 4 Procjena uspješnosti pretvorbe kalcijeva karbonata ljuske jaja u kalcijev klorid

| Uzorak | $m(\text{CaCO}_3)^*$ [g] | $m(\text{CaCl}_2)_T^{**}$ [g] | $m(\text{CaCl}_2)_{\text{exp}}^{***}$ [g] | Prinos $(\text{CaCl}_2)^{****}$ [%] |
|-------------|-----------------------------|----------------------------------|--|--|
| Ljuska jaja | 544,45 ± 6,22 | 603,71 ± 6,90 | 606,88 ± 10,54 | 100,53 ± 1,56 |

* masa kalcijeva karbonata procijenjena na osnovi podataka o kemijskom sastavu ljuske jaja prikazanom u **Tablici 1**

** teorijska masa kalcijeva klorida izračunata na osnovi stehiometrijskih koeficijenata i molekularne mase kalcijeva klorida i kalcijeva karbonata

*** eksperimentalno dobivena masa kalcijeva klorida rezultat je tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele

**** prinos na kalcijevu kloridu izračunat je iz odnosa eksperimentalno dobivenih podataka i teoretski izračunate mase kalcijeva klorida

Obzirom da ljuska jaja kao otpad u svom sastavu sadrži određeni udio proteina (**Tablica 1**) bilo je očekivano da će određeni dio proteina nakon obrade ljuske jaja 5 % kloridnom kiselinom prijeći u otopinu. Shodno tome proizvedene otopine kalcijeva klorida su analizirane na koncentraciju proteina Bradfordičinom metodom, a rezultati analize prikazani su u **Tablici 5**. Otopine kalcijeva klorida sadržavale su malu količinu proteina ($\gamma = 0,35 \pm 0,04$ g/L), pri čemu je udio proteina po masi proizvedenog kalcijeva klorida iznosio 0,58 ± 0,06 %. Usporedi li se masena koncentracija proteina u otopinama kalcijeva klorida sa maksimalnom teoretskom koncentracijom proteina koja bi mogla prijeći u otopinu ($\gamma \sim 2,27$ g/L) i to na osnovi podataka o udjelu proteina u ispranoj ljusci jaja (**Tablica 1**) tada se može zaključiti da je u otopinu prešlo svega oko 15 % proteina od ukupnih proteina ljuske jaja.

Tablica 5 Masena koncentracija, ukupna masa i udio proteina u otopinama dobivenim nakon obrade ljuske jaja 5 % otopinom kloridne kiseline^{*,**}

| Uzorak | γ (proteini) [g/L] | m (proteini) [g] | w (proteini) ^{***} [g/100 g] |
|---------|---------------------------|--------------------|---|
| Otopina | 0,35 ± 0,04 | 3,50 ± 0,41 | 0,58 ± 0,06 |

* masena koncentracija proteina u otopini određena je nakon slijedne filtracije otopine kroz filter papir Whatman 114 i Whatman 1

** koncentracija proteina je određena Bradfordičinom metodom

*** udio proteina izražen je masu proizvedenog kalcijeva klorida

Dobiveni podaci o masenoj koncentraciji proteina u otopinama kalcijeva klorida nešto su viši od podataka navedenih od Tomičić (2020) koje je zabilježila upola nižu koncentraciju proteina u otopinama kalcijeva klorida ($\gamma = 0,17 \pm 0,04$ g/L). Najvjerojatniji razlog tomu je činjenica da je u ovom diplomskom radu tijekom otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja korišteno intenzivnije miješanje od onoga kod Tomičić (2020) što je moglo rezultirati poboljšanim otapanjem djelomično denaturiranih proteina kalcificiranog matriksa ljuske jaja.

Istraživanja Liu i suradnika (2016) pokazala su da se u sastavu kalcificiranog matriksa ljuske jaja i membrana jaja nalazi i mala količina glikozaminoglikana i proteoglikana, pri čemu u istima dominiraju glukuronska kiselina i *N*-acetilgalaktozamin, slijeđeni nižim udjelom *N*-acetilglukozamina, glukozamina, galaktozamina i galaktoze. Stoga je bilo za očekivati da će tijekom potpunog otapanja kalcificiranog matriksa ljuske jaja doći do oslobađanja određene količine glikozaminoglikana u otopinu kalcijeva klorida, te potencijalno djelomične ekstrakcije glikozaminoglikana sastavnih membrana jaja. Štoviše, prema podacima Gizatuline i sur. (2005) te Dolgopyatove i sur. (2013) bilo je za očekivati da će doći i do djelomične hidrolize glikozaminoglikana u otopini, kao i deacetilacije oslobođenih amino-šećera. Shodno tome, u otopinama je određen udio amino-šećera Morgan-Elsonovom metodom, a podatci analize prikazani su u **Tablici 6**.

Tablica 6 Masena koncentracija, ukupna masa i udio amino-šećera u otopinama dobivenim nakon obrade ljuske jaja 5 % otopinom kloridne kiseline^{*,**}

| Uzorak | γ (amino-šećeri) [g/L] | m (amino-šećeri) [g] | w (amino-šećeri) ^{***} [g/100 g s.t.] |
|---------|-------------------------------|------------------------|--|
| Otopina | 0,129 ± 0,005 | 1,286 ± 0,055 | 0,228 ± 0,055 |

* masena koncentracija amino-šećera u otopini određena je nakon slijedne filtracije otopine kroz filter papir Whatman 114 i Whatman 1

** koncentracija amino-šećera je određena Morgan-Elsonovom metodom

*** udio amino-šećera izražen je na suhu tvar ljuske jaja

Iz **Tablice 6** je vidljivo da tijekom otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja u 5 % otopini kloridne kiseline dolazi do oslobađanja određene količine glikozaminoglikana u otopinu soli, pri čemu koncentracija amino-šećera po potpunom otapanju ljuske jaja u otopini kalcijeva klorida iznosi $0,129 \pm 0,005$ g/L. Kako u dostupnoj literaturi za sada ne postoji podatak o sadržaju šećera i/ili amino-šećera u otopinama kalcijeva klorida proizvedenim iz ljuske jaja, dobiveni podaci o sadržaju amino-šećera u otopinama kalcijeva klorida čine hvalevrijednu informaciju.

Proizvodnja kalcijeva klorida iz ljuske jaja provedena je otapanjem kalcijeva karbonata u 5 % otopini kloridne kiseline pri čemu je odnos molova kalcijeva karbonata i kloridne kiseline bio 1:2,55, što znači da je proces proizvodnje provođen u suvišku kloridne kiseline. Stoga je višak kiseline zaostao u otopinama soli kalcijeva klorida po provedenoj filtraciji bilo potrebno neutralizirati. Neutralizacija viška kloridne kiseline provedena je dodavanjem praškastog kalcijeva hidroksida, pri čemu je uz neutralizaciju istovremeno provođen i proces flokulacije organske tvari kako je to opisano u poglavlju 3.2.5. Po završetku procesa, otopine su filtrirane te im je određena koncentracija kalcijeva klorida, proteina i amino-šećera. U **Tablici 7** prikazana je masena koncentracija i ukupna masa kalcijeva klorida u otopinama dobivenim nakon neutralizacije suviška kloridne kiseline i flokulacije organske tvari kalcijevim hidroksidom, a **Tablici 8** procjena uspješnosti neutralizacije suviška kloridne kiseline kalcijevim hidroksidom.

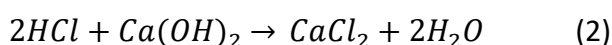
Tablica 7 Masena koncentracija i ukupna masa kalcijeva klorida u otopinama dobivenim nakon neutralizacije suviška kloridne kiseline i flokulacije organske tvari kalcijevim hidroksidom^{*, **}

| Uzorak | $\gamma(\text{CaCl}_2)$ [g/L] | $m(\text{CaCl}_2)$ [g] |
|---------|-------------------------------|------------------------|
| Otopina | $72,02 \pm 2,93$ | $731,68 \pm 19,69$ |

* masena koncentracija kalcijeva klorida u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele

Neutralizacija suviška kloridne kiseline kalcijevim hidroksidom dovela je do očekivanog povećanja masene koncentracije kalcijeva klorida, kao i ukupne mase kalcijeva klorida, budući je višak kloridne kiseline reagirao sa dodanim kalcijevim hidroksidom stvarajući kalcijev klorid (jednadžba 2).



Shodno tome, početna koncentracija kalcijeva klorida je sa početnih $60,69 \pm 1,05$ g/L (**Tablica 3**) povećana na $72,02 \pm 2,93$ g/L nakon neutralizacije (**Tablica 7**). Kada su rezultati eksperimentalnog prinosa na kalcijevom kloridu po provedenoj neutralizaciji kalcijevim hidroksidom uspoređeni sa teoretskim (**Tablica 8**) tada se mogla zamijetiti gotovo potpuna pretvorba suviška kloridne kiseline u kalcijev klorid koja je prosječno iznosila $99,36 \pm 1,24$ %.

Tablica 8 Procjena uspješnosti neutralizacije suviška kloridne kiseline kalcijevim hidroksidom

| Uzorak | $m(\text{CaCl}_2)_T^*$ [g] | $m(\text{CaCl}_2)_{\text{exp}}^{**}$ [g] | Prinos $(\text{CaCl}_2)^{***}$ [%] |
|-------------|-------------------------------|---|---------------------------------------|
| Ljuska jaja | $736,44 \pm 20,99$ | $731,68 \pm 19,65$ | $99,36 \pm 1,24$ |

* teorijska masa kalcijeva klorida izračunata je kao suma eksperimentalno određene mase kalcijeva klorida u otopinama nakon kiselinske obrade ljuske jaja te teoretski izračunate mase kalcijeva klorida na temelju dane mase kalcijeva hidroksida

** eksperimentalno dobivena masa kalcijeva klorida rezultat je tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u pet (5) paralela

*** prinos na kalcijevu kloridu izračunat je iz odnosa eksperimentalno dobivenih podataka i teoretski izračunate mase kalcijeva klorida

Kako je proces neutralizacije suviška kloridne kiseline kalcijevim hidroksidom istovremeno uključivao i proces flokulacije organske tvari, to je u filtriranim otopinama kalcijeva klorida nakon neutralizacije suviška kloridne kiseline i flokulacije organske tvari određena i masena koncentracija proteina i amino-šećera, što je prikazano **Tablicama 9 i 10**.

Tablica 9 Masena koncentracija, ukupna masa i udio proteina zaostalih u otopinama dobivenim nakon flokulacije organske tvari kalcijevim hidroksidom^{*,**}

| Uzorak | $\gamma(\text{proteini})$ [g/L] | $m(\text{proteini})$ [g] | Zaostali proteini ^{***} [%] |
|---------|---------------------------------|--------------------------|---|
| Otopina | $0,109 \pm 0,012$ | $1,145 \pm 0,127$ | $32,937 \pm 4,103$ |

* masena koncentracija proteina u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** koncentracija proteina je određena Bradfordičinom metodom

*** udio zaostalih proteina izražen je kao odnos proteina u otopini nakon flokulacije i proteina u otopini nakon otapanja ljuske jaja kloridnom kiselinom

Flokulacija organske tvari kalcijevim hidroksidom dovela je do sniženja koncentracije proteina u otopinama kalcijeva klorida, pri čemu je procesom flokulacije uklonjeno oko 67 % proteina prisutnih u otopinama kalcijeva klorida nakon otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja u otopini 5 %-tne kloridne kiseline. S druge strane, flokulacija organske tvari kalcijevim hidroksidom se pokazala poprilično neučinkovitom u uklanjanju amino-šećera prisutnih u otopinama kalcijeva klorida, budući je u otopinama zaostalo oko 96 % amino-šećera detektiranih

u otopinama kalcijeva klorida nakon potpunog otapanja ljuske jaja u kloridnoj kiselini. Najvjerojatniji razlog tomu je da su amino-šećeri u otopinama kalcijeva klorida prisutni u monosaharidnoj formi, pri čemu je utjecaj kalcijeva hidroksida na njihovo taloženje minimalan.

Tablica 10 Masena koncentracija, ukupna masa i udio amino-šećera zaostalih u otopinama dobivenim nakon flokulacije organske tvari kalcijevim hidroksidom ^{*,**}

| Uzorak | γ (amino-šećeri) [g/L] | m (amino-šećeri) [g] | Zaostali amino-šećeri ^{***} [%] |
|---------|-------------------------------|------------------------|--|
| Otopina | 0,118 ± 0,007 | 1,239 ± 0,069 | 96,302 ± 1,339 |

* masena koncentracija amino-šećera u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** koncentracija amino-šećera je određena Morgan-Elsonovom metodom

*** udio zaostalih amino-šećera izražen je kao odnos amino-šećera u otopini nakon flokulacije i amino-šećera u otopini nakon otapanja ljuske jaja kloridnom kiselinom

Završni korak u pripremi otopina kalcijeva klorida za postupak sušenja raspršivanjem bio je uparavanje otopina kalcijeva klorida na 1/10 volumena, odnosno na koncentraciju između 560 i 580 g/L koja se prema patentu US3433863 Bowdena i sur. (1969) pokazala najoptimalnijom za dobivanje praškastog kalcijeva klorida s najmanjim udjelom vode. Postupak uparavanja proveden je na način kako je to opisano u poglavlju 3.2.5., a filtrirani koncentrat kalcijeva klorida ispitan je na koncentraciju kalcijeva klorida, proteina i amino-šećera.

U **Tablici 11** prikazani su rezultati analize masene koncentracije, ukupne mase i prinosa kalcijeva klorida u otopinama nakon uparavanja iz koje je vidljivo da je koncentracija kalcijeva klorida u uparenim otopinama oko 10 % niža od koncentracije zabilježene nakon neutralizacije kalcijevim hidroksidom (**Tablica 7**), što se dijelom može pripisati gubitcima izazvanim tijekom manipulacije sa ugušćenom otopinom.

Tablica 11 Masena koncentracija, ukupna masa i prinos kalcijeva klorida u otopinama nakon uparavanja ^{*,**}

| Uzorak | γ (CaCl ₂) [g/L] | m (CaCl ₂) [g] | Prinos (CaCl ₂) ^{***} [%] |
|---------|-------------------------------------|------------------------------|--|
| Otopina | 590,89 ± 18,92 | 665,15 ± 16,46 | 90,91 ± 0,70 |

* masena koncentracija kalcijeva klorida u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri (3) neovisna određivanja od kojih je svako provedeno u tri (3) paralele

*** prinos na kalcijevu kloridu izračunat je iz odnosa mase kalcijeva klorida u otopinama nakon uparavanja i otopinama nakon neutralizacije i flokulacije

Uparavanje otopina kalcijeva klorida, isto tako dovelo je do sniženja koncentracije proteina i amino-šećera u otopinama kalcijeva klorida (**Tablice 12 i 13**), što se može pripisati reakciji ne-enzimske glikozilacije između u otopini prisutnih proteina i amino-šećera tijekom petosatnog uparavanja pri čemu su nastali netopljivi umreženi Maillardovi produkti koji su za vrijeme filtracije uparenih soli zaostali na filter papiru.

Tablica 12 Masena koncentracija, ukupna masa i udio proteina zaostalih u otopinama nakon uparavanja^{*,**}

| Uzorak | γ (proteini) [g/L] | m (proteini) [g] | zaostali proteini ^{***} [%] |
|---------|---------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Otopina | 0,031 ± 0,016 | 0,035 ± 0,017 | 1,010 ± 0,461 |

* masena koncentracija proteina u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** koncentracija proteina je određena Bradfordičinom metodom

*** udio zaostalih proteina izražen je kao odnos proteina u otopini nakon uparavanja i proteina u otopini nakon otapanja ljuske jaja kloridnom kiselinom

U prilog tomu govore podaci o količini zaostalih proteina u uparenim otopinama kalcijeva klorida u kojima je pronađeno da svega 1 % od ukupnih proteina prisutnih u otopinama kalcijeva klorida nakon potpunog otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja zaostaje u otopinama (**Tablica 12**), kao i podatci o količini amino-šećera koja je sa početne koncentracije u otopinama kalcijeva klorida nakon potpunog otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja (**Tablica 6**) snižena za oko 83 % (**Tablica 13**).

Tablica 13 Masena koncentracija, ukupna masa i udio amino-šećera zaostalih u otopinama nakon uparavanja^{*,**}

| Uzorak | γ (amino-šećeri) [g/L] | m (amino-šećeri) [g] | Zaostali amino-šećeri ^{***} [%] |
|---------|-------------------------------|------------------------|--|
| Otopina | 0,192 ± 0,030 | 0,216 ± 0,026 | 16,746 ± 1,358 |

* masena koncentracija amino-šećera u otopini određena je nakon slijedne filtracije suspenzije kroz filter papir Whatman 1

** koncentracija amino-šećera je određena Morgan-Elsonovom metodom

*** udio zaostalih amino-šećera izražen je kao odnos amino-šećera u otopini nakon uparavanja i amino-šećera u otopini nakon otapanja ljuske jaja kloridnom kiselinom

4.3. Optimizacija uvjeta za proizvodnju praškastog kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je i optimizirati proizvodnju praškastog kalcijeva klorida iz pripremljenih koncentriranih otopina, a sve u svrhu kako bi se dobio završni proizvod niskog udjela vlage. Zbog toga su provedena preliminarna istraživanja u kojima su uz konstantnu temperaturu ulaznog zraka od 210 °C podešavani uvjeti protoka pumpe i protoka zraka, a rezultati su prikazani u **Tablici 14**. Vidljivo je da je povećanjem protoka pumpe u načelu dolazilo do povećanja vlažnosti praškastog kalcijeva klorida, dok je povećanjem protoka zraka vlažnost kalcijeva klorida pri istom protoku pumpe bila nešto niža. Navedeno se može pojasniti činjenicom da se povećanjem protoka pumpe u uređaj dovodi veći volumen otopine koju je potrebno osušiti te je sukladno tome potrebna i veća energija kako bi se uklonila slobodna i vezana voda. Upravo u tome leži razlog smanjenja vlažnosti produkta u slučaju manjeg protoka pumpe, odnosno većeg protoka vrućeg zraka.

Analizom dobivenih podataka preliminarnih istraživanja (**Tablica 14**) najoptimalnijim uvjetima sušenja raspršivanjem su se pokazali protok pumpe od 5 % i protok zraka od 30 L/min pri kojima je postignut najviši prinos (prinos = 91,67 %) i najniža vlažnost kalcijeva klorida (vlažnost = 2,15 %) u ciklonu. Stoga su upravo ovi uvjeti sušenja raspršivanjem odabrani kao najoptimalniji za sušenje raspršivanjem koncentriranih otopina dobivenih u tri neovisna proizvodna postupka.

4.4. Sušenje raspršivanjem i prinosi kalcijeva klorida

U **Tablici 15** prikazani su rezultati tri neovisna postupka proizvodnje praškastog kalcijeva klorida iz ljuske jaja pri čemu je sušenje raspršivanjem provedeno pri gore navedenim odabranim optimalnim uvjetima. Vidljivo je da su pri navedenim uvjetima dobivene praškaste soli kalcijeva klorida u kojima je udio vode bio nemjerljiv, a potvrdu o nedostatku slobodne vode daju i FTIR-ATR spektri proizvedenih soli (**Slika 6**) koji upućuju da je dobiven bezvodni kalcijev klorid. Sveukupni prinos kalcijeva klorida u ciklonu i tornju iznosio je $94,32 \pm 1,10$ % od početne mase kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini podvrgnutoj uparavanjem. Pri tome je u ciklonu udio praškastih soli kalcijeva klorida iznosio $91,29 \pm 0,19$ %, a prinos na početnu masu kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini $86,10 \pm 1,16$ %.

Tablica 14 Optimizacija uvjeta sušenja rasprišivanjem koncentrirane otopine kalcijeva klorida

| Uvjeti sušenja | $\gamma(\text{CaCl}_2)$ [g/L] | $T_{(\text{ulaz})}$ [°C] | $T_{(\text{izlaz})}$ [°C] | Protok pumpe [%] | Protok zraka [L/min] | Vlažnost CaCl_2 ciklon [%]* | Vlažnost CaCl_2 toranj [%]** | Udio CaCl_2 ciklon [%]*** | Udio CaCl_2 toranj [%]**** | Prinos CaCl_2 [%]***** |
|----------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| I. | 577,56 ± 7,68 | 210 | 146 | 5 | 30 | 2,15 | 4,59 | 91,67 | 8,33 | 92,08 |
| II. | 577,56 ± 7,68 | 210 | 146 | 10 | 20 | 7,86 | 4,90 | 90,93 | 9,07 | 90,20 |
| III. | 577,56 ± 7,68 | 210 | 146 | 10 | 30 | 6,99 | 4,87 | 90,88 | 9,12 | 89,42 |
| IV. | 577,56 ± 7,68 | 210 | 132 | 15 | 25 | 8,44 | 6,86 | 88,30 | 11,70 | 92,19 |
| V. | 577,56 ± 7,68 | 210 | 132 | 20 | 25 | 8,22 | 11,56 | 80,33 | 19,67 | 91,38 |

* vlažnost kalcijeva klorida u ciklonu

** vlažnost kalcijeva klorida u tornju

*** udio kalcijeva klorida u ciklonu izračunat je kao odnos mase kalcijeva klorida u ciklonu i sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju

**** udio kalcijeva klorida u tornju je kao odnos mase kalcijeva klorida u tornju i sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju

***** prinos kalcijeva klorida izračunat je kao odnos sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju i mase kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini

Tablica 15 Proizvodnja praškastog kalcijeva klorida primjenom sušenja raspršivanjem pri optimalnim uvjetima ^a

| Uzorak | $\gamma(\text{CaCl}_2)$ [g/L] | Vlažnost CaCl_2 [%] | $m(\text{CaCl}_2)_o$ [g] ^b | $m(\text{CaCl}_2)_c$ [g] ^c | $m(\text{CaCl}_2)_T$ [g] ^d | $m(\text{CaCl}_2)_{c+T}$ [g] ^e | $w(\text{CaCl}_2)_c$ [%] ^f | $w(\text{CaCl}_2)_T$ [%] ^g | Prinos $(\text{CaCl}_2)_c$ [%] ^h | Prinos $(\text{CaCl}_2)_T$ [%] ⁱ | Prinos $(\text{CaCl}_2)_{c+T}$ [%] ^j |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------------|--|--|--|--|--|--|---|---|---|
| CaCl_2 | 590,89 ± 18,92 | 97,62 ± 1,79 | 665,15 ± 16,46 | 572,85 ± 23,38 | 54,64 ± 0,98 | 627,48 ± 24,30 | 91,29 ± 0,19 | 8,71 ± 0,19 | 86,10 ± 1,16 | 8,22 ± 0,11 | 94,32 ± 1,10 |

^a optimalni uvjeti sušenja raspršivanjem: ulazna temperatura = 210°C, protok pumpe = 5 %, protok zraka 30 L/min; aspirator = 100 %, izlazna temperatura = 146 °C;

rezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija 3 neovisna sušenja raspršivanjem

^b masa kalcijeva klorida u uparenoj otopini

^c masa kalcijeva klorida u ciklonu nakon sušenja raspršivanjem

^d masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju nakon sušenja raspršivanjem

^e suma masi kalcijeva klorida u ciklonu i tornju nakon sušenja raspršivanjem

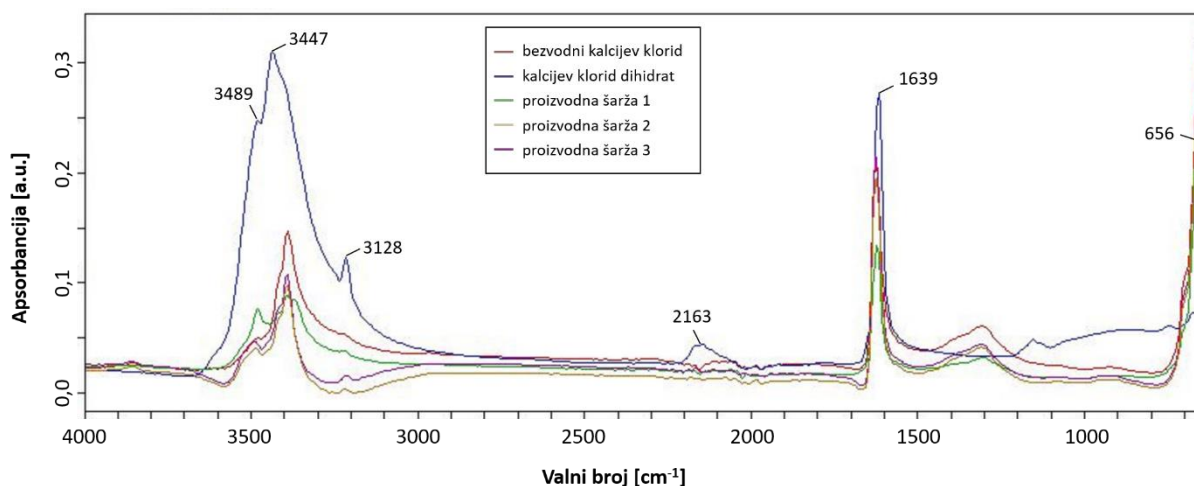
^f udio kalcijeva klorida u ciklonu izračunat je kao odnos mase kalcijeva klorida u ciklonu i sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju

^g udio kalcijeva klorida u ciklonu izračunat je kao odnos mase kalcijeva klorida u ciklonu i sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju

^h prinos kalcijeva klorida u ciklonu izračunat je kao odnos mase kalcijeva klorida u ciklonu i mase kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini

ⁱ prinos kalcijeva klorida u ciklonu i tornju izračunat je kao odnos mase kalcijeva klorida u ciklonu i mase kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini

^j sveukupni prinos kalcijeva klorida izračunat je kao odnos sume masa kalcijeva klorida u ciklonu i tornju i mase kalcijeva klorida u koncentriranoj otopini



Slika 6 FTIR-ATR spektri praškastih soli kalcijeva klorida proizvedenih iz ljuske jaja

U **Tablici 16** prikazani su prinosi na kalcijevu kloridu dobivenog kiselinom obradom ljuske jaja i slijednim sušenjem raspršivanjem. Pri tome su prinosi izraženi obzirom na masu kalcijeva klorida u ciklonu i to u odnosu na masu ljuske jaja ili kalcijev karbonat. Iz tablice je vidljivo da su prinosi u svim načinima izražavanja viši od 86 %, a kao najrelevantniji podatak prinosa treba promatrati onaj vezan uz prinos na kalcijevu kloridu nakon uparavanja ($86,10 \pm 1,39$ g/100 g_{s.t.}), budući je neutralizacijom suviška kiseline kalcijevih hidroksidom povećana koncentracija kalcijeva klorida u odnosu na početni udio kalcijeva karbonata u ljusci jaja.

Tablica 16 Prinosi kalcijevog klorida proizvedenog iz ljuske jaja^{*, **}

| Parametar | Vrijednost |
|--|---------------|
| Prinos CaCl ₂ na vlažnu masu ljuske jaja [g/100 g _{v.m.}] | 88,13 ± 3,60 |
| Prinos CaCl ₂ na suhu tvar ljuske jaja [g/100 g _{s.t.}] | 102,42 ± 3,31 |
| Prinos CaCl ₂ na kalcijev karbonat ljuske jaja [g/100 g _{s.t.}] | 105,19 ± 3,18 |
| Prinos CaCl ₂ na masu kalcijeva klorida u otopinama nakon uparavanja [g/100 g _{s.t.}] | 86,10 ± 1,39 |

* rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija 3 neovisna proizvodna postupka

** prinosi su izračunati u odnosu na masu kalcijeva klorida u ciklonu

Usporedi li se prinos proizvedenog kalcijeva klorida iz ljuske jaja sa literaturno dostupnim podacima, tada se može reći da je vrlo sličan prinosu na bezvodnom kalcijevu kloridu navedenom od strane Domrongpokkaphan i Khemkhao (2017) (prinos 86,52 % uz 10 % kloridnu kiselinu). S druge strane, Garnjanagoonchorn i Changpuak (2007) navode nešto veće prinose i do 90,80 %, pri čemu su prinosi izraženi na masu ljuske jaja, što je vrlo slično prinosu po vlažnoj masi ljuske jaja u dobivenom u ovom radu ($88,13 \pm 3,60$ %). Međutim, ključno je za

navesti da su autori proizveli dominantno kalcijev klorid dihidrat, a ne bezvodni kalcijev klorid. Nadalje, Tomičić (2020) navodi nešto više prinose po masi vlažne ljuske jaja ($108,74 \pm 3,62$ g/100 g vlažne ljuske jaja), odnosno $128,63 \pm 4,80$ g suhe tvari soli po 100 g suhe tvari ljuske jaja, što se može protumačiti činjenicom da je autorica umjesto bezvodnog kalcijeva klorida proizvela smjesu monohidratne i dihidratne forme kalcijeva klorida.

4.5. Karakterizacija proizvedenih praškastih soli kalcijeva klorida

Proizvedene praškaste soli kalcijeva klorida bilo je potrebno karakterizirati kako bi se ustanovilo koji oblik soli kalcijeva klorida je proizveden, te udovoljavaju li zahtjevima za čistoću aditiva. U tu svrhu prvo je provedeno snimanje infracrvenih spektara (FTIR-ATR) proizvedenih praškastih soli te su FTIR-ATR spektri proizvedenih soli uspoređeni sa FTIR-ATR spektrima komercijalno dostupnih bezvodnog kalcijeva klorida i kalcijeva klorida dihidrata (**Slika 6**). FTIR-ATR spektri proizvedenih soli kalcijeva klorida iz ljuske jaja i komercijalno dostupnih soli kalcijeva klorida (**Slika 6**) pokazali su identičan položaj apsorpcijskih vrpca pri čemu sve detektirane vrpce odgovaraju vibracijskim ili deformacijskim energijama istezanja, savijanja ili mahanja -OH ili H-O-H veza kristalne vode u solima. Proizvedene soli pokazivale su intenzitete apsorpcije podjednake ili niže od intenziteta apsorpcije zabilježenih u slučaju komercijalno dostupnog bezvodnog kalcijeva klorida, što upućuje da je iz ljuske jaja primjenom kiselinske obrade i slijednog sušenja raspršivanjem proizveden bezvodni kalcijev klorid. U prilog tome govori podatak o udjelu kalcijeva klorida u proizvedenim solima (**Tablica 17**) koji je iznosio $96,96 \pm 1,74$ g/100 g_{s.t.} što više od minimalno definiranog udjela kalcijeva klorida u bezvodnom kalcijevu kloridu kao aditivu (EC, 2012; FAO, 1992).

Uz određivanje udjela kalcijeva klorida u proizvedenim solima, karakterizacija je uključivala i druge parametre: topljivost u vodi, pH vrijednost 10 %-tne vodene otopine, udio slobodnih alkalija, udio vodotopljivih proteina, udio ukupnih proteina te udio amino-šećera (**Tablica 17**).

Analiza topljivosti proizvedenih soli kalcijeva klorida pokazala je da topljivost soli iznosi najviše 0,8 g po 1 mL vode (**Tablica 17**) što je u skladu sa definiranom klasom topljivosti „*freely soluble*“ za kalcijev klorid (FAO, 1992.; FAO, 2006.). Sličnu topljivost kalcijeva klorida proizvedenog iz ljuske jaja primjenom 4 % i 6 % kloridne kiseline navode i

Domrongpökkaphan i Khemkhao (2017), dok Garnjanagoonchorn i Changpuak (2007) navode topljivost do 1 g proizvedene soli po 1 mL vode.

Tablica 17 Karakterizacija kalcijeva klorida dobivenog iz ljuske jaja^a

| Parametar | Propisane vrijednosti ^b | Vrijednost |
|---|------------------------------------|--------------|
| Udio kalcijeva klorida [g/100 g _{s.t.}] | ≥ 93,00 | 96,96 ± 1,74 |
| Topljivost u vodi [g/mL] | - | ≤ 0,8 |
| pH 10 % otopine | - | 9,46 ± 0,16 |
| Udio slobodnih alkalija ^c [%] | ≤ 0,150 | < 0,074 |
| Topljivi proteini ^d [g/100 g _{s.t.}] | - | 0,05 ± 0,01 |
| Ukupni proteini ^e [%] | - | 0,21 ± 0,06 |
| Aminošećeri [g/100 g _{s.t.}] | - | 0,16 ± 0,01 |

^aRezultati predstavljaju srednju vrijednost ± standardna devijacija tri neovisno proizvedena uzorka kalcijeva klorida pri čemu su analize provedene najmanje u triplikatu

^bPropisane vrijednosti preuzete iz sljedećih referenci: EC (2012.); FAO (1992.)

^cUdio slobodnih alkalija izražen kao udio Ca(OH)₂

^dUdio proteina određen Bradfordičinom metodom

^eUdio proteina određen metodom po Kjeldahlu

Određivanjem pH vrijednosti 10 %-tnih vodenih otopina proizvedenih soli kalcijeva klorida ustanovljene su vrijednosti pH u rasponu od 9,31 do 9,68 pri čemu je prosječna pH vrijednost otopina soli iznosila 9,46 ± 0,16 (**Tablica 17**). Zabilježene vrijednosti bile su nešto malo niže od vrijednosti pH za 10 %-tnu otopinu komercijalno dostupnog bezvodnog kalcijeva klorida (pH = 9,95) što upućuje na visok stupanj čistoće proizvedenih soli. Nešto niže pH vrijednosti 10 %-tnih otopina proizvedenog kalcijeva klorida iz ljuske jaja zabilježila je Tomičić (2020) u svom radu (pH = 9,34 ± 0,15), dok Garnjanagoonchorn i Changpuak (2007) navode znatno nižu pH vrijednost od 5,27.

Sukladno zahtjevima čistoće kalcijeva klorida kao aditiva, udio slobodnih alkalija u solima izraženih kao %-tak kalcijeva hidroksida ne bi trebao biti viši od 0,15 % (FAO, 1992; FAO, 2006). Rezultati analize udjela slobodnih alkalija u proizvedenim solima (**Tablica 17**) pokazuju da proizvedene soli udovoljavaju ovom zahtjevu budući je udio alkalija iznosio manje od 0,074 %.

Koncentracija vodotopljivih proteina u 10 %-tnim vodenim otopinama soli određena je Bradfordičinom metodom te je ustanovljeno da proizvedene soli sadrže 0,05 ± 0,01 g vodotopljivih proteina na 100 g suhe tvari (**Tablica 17**). Za razliku od toga u kalcijevom

kloridu koju je iz ljuske jaja proizvela Tomičić (2020) proizvedene soli kalcijeva klorida nisu sadržavale mjerljivu količinu proteina.

Uz određivanje udjela vodotopljivih proteina u solima određen je i udio ukupnih proteina metodom po Kjeldahl-u, te je pronađeno da proizvedene soli sadrže $0,21 \pm 0,06$ % (**Tablica 17**), što je niže od vrijednosti koju navode Garnjanagoonchorn i Changpuak (2007) za kalcijev klorid proizveden iz ljuske jaja (0,29 %).

Obzirom da je u koncentriranim otopinama soli (**Tablica 13**) zabilježena određena količina amino-šećera, udio amino-šećera određen je i u proizvedenim praškastim solima. Rezultati analize su pokazali da proizvedene praškaste soli sadrže $0,16 \pm 0,01$ g amino-šećera na 100 g suhe tvari soli (**Tablica 17**). U dostupnoj literaturi ne postoje podatci o udjelu amino-šećera u solima kalcijeva klorida proizvedenog iz ljuske jaja.

Tablica 18 Mikrobiološka ispravnost proizvedenog kalcijeva klorida

| Parametar | Mikrobiološki kriteriji* | Proizvodna šarža 1 | Proizvodna šarža 2 | Proizvodna šarža 3 |
|------------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aerobne, mezofilne bakterije | ≤ 2500 CFU/g | 1450 | 290 | 1350 |
| <i>E. coli</i> | ≤ 5 MPN metodom/g | 0 | 0 | 0 |
| <i>Salmonella</i> | negativna | 0 | 0 | 0 |
| Koliformi | ≤ 10 MPN metodom/g | 0 | 0 | 0 |
| <i>S. aureus</i> | ≤ 10 CFU/g | 0 | 0 | 0 |
| Mezofilne spore | ≤ 25 CFU/g | 86 | 0 | 5 |
| Termofilne spore | ≤ 10 CFU/g | 0 | 0 | 0 |
| Kvasci | ≤ 10 CFU/g | 0 | 0 | 0 |
| Plijesni | ≤ 200 CFU/g | 15 | 5 | 0 |

* mikrobiološki kriteriji (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, **2009**)

Ljuska jaja se klasificira kao nusproizvod životinjskog podrijetla koji nije namijenjen za proizvodnju proizvoda za prehranu ljudi, već se sukladno zakonskoj regulativi (Uredba (EZ) br. 1069/2009) može iskoristiti za proizvodnju hrane za životinje iz uzgoja, proizvodnju hrane za kućne ljubimce, proizvodnju organskih gnojiva i poboljšivača tla, kao i proizvodnju komposta i bioplina. Međutim, neovisno o Uredbi (EZ) br. 1069/2009, ipak se pod posebnim uvjetima prerade uz pozitivno mišljenje Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) može iskoristiti i za proizvodnju proizvoda za prehranu ljudi (Strelec i sur., 2021). Pri tome je jedan od ključnih parametara za procjenu i mikrobiološka i zdravstvena ispravnost tako

proizvedenog proizvoda. Stoga su praškaste soli kalcijeva klorida proizvedene iz ljuske jaja analizirane na mikrobiološku ispravnost (**Tablica 18**). Vidljivo je kako gotovo svi uzorci proizvodnih šarži 1-3 zadovoljavaju mikrobiološke kriterije, osim uzorka proizvodne šarže 1 i to po broju aerobnih mezofilnih spora koje su prisutne u gotovo 3,5 puta većem broju od dozvoljenog ≤ 25 CFU/g (86). Razlog tomu može biti sama početna sirovina koja je više kontaminirana sporama bakterija, a iz broja aerobnih mezofilnih bakterija iste šarže može se uočiti povećan broj (iako je ispod dozvoljene granice). U ovoj skupini svih mezofilnih bakterija nalaze se i sporogene, koje će porasti nakon pasterizacije uzorka pri $80\text{ }^{\circ}\text{C}/10$ minuta što uništava sve vegetativne stanice bakterija. Slična situacija je i s uzorkom proizvodne šarže 3, iako je u ovom uzorku prisutno samo 5 spora/g. Sa smanjenjem broja ukupnih mezofilnih bakterija (proizvodna šarža 2), ukupno je i manje spora (nisu niti prisutne u analiziranom uzorku, nakon pasterizacije). Brojevi ostalih mikroorganizama su vrlo niski, a svakako je potrebno naglasiti kako niti u jednom uzorku nije ustanovljena prisutnost niti jedne skupine patogenih bakterija. Shodno tome, može se zaključiti da izuzev proizvodne šarže 1, predloženi postupak proizvodnje praškastog kalcijeva klorida udovoljava kriterijima za proizvodnju proizvoda/aditiva za ljudsku uporabu.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Potpuno izdvajanje proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka tijekom ispiranja ljuske jaja u šaržnom reaktoru volumena 15 L postiže se ispiranjem ljuske jaja vodovodnom vodom 3×10 min.
- Postupak cjelokupnog otapanja ljuske jaja 5 %-om kloridnom kiselinom u šaržnom reaktoru volumena 15 L postiže se nakon 3 h i 30 minuta, pri čemu se iz 650 g vlažne ljuske jaja dobiva otopina kalcijeva klorida masene koncentracije 60,69 g/L, uz 100 %-tni prinos.
- Tijekom obrade dobivene otopine kalcijeva klorida koja uključuje neutralizaciju kalcijevim hidroksidom i flokulaciju, filtraciju i ugušćivanje na 1/10 volumena snižava se udio proteina i amino-šećera u otopini kalcijeva klorida.
- Preliminarno istraživanje uvjeta sušenja raspršivanjem pokazuje da su optimalni uvjeti sušenja raspršivanjem: protok pumpe 5 % i protok zraka od 30 L/min pri temperaturi sušenja od 210 °C.
- Primjenom proizvodnog postupka koji uključuje a) ispiranje ljuske jaja, b) kiselinsku obradu, c) filtraciju, d) neutralizaciju i flokulaciju, e) filtraciju, f) uparavanje, g) filtraciju te h) sušenje raspršivanjem dobiven je bezvodni kalcijev klorid visokog stupnja čistoće i zadovoljavajuće zdravstvene ispravnosti uz prinos od 88 % na masu vlažne ljuske jaja.

6. LITERATURA

- Al-Awwal NY, Ali UL: Proximate Analyses of Different Samples of Egg Shells Obtained from Sokoto Market in Nigeria. *International Journal of Science and Research* 4(3):564-566, 2015.
- Arabhosseini A, Faridi H: Application of eggshell wastes as valuable and utilizable products: A review. *Research in Agricultural Engineering* 64:104-114, 2018.
- Baláž M: Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia* 10:3827-3843, 2014.
- Bowden JH, Clifford TT: Process for preparing powder and granular calcium chloride products. US3339618A, 1969.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254, 1976.
- Budžaki S, Ostojčić M, Strelec I: Heterogeni biokatalizatori na bazi otpada/nusproizvoda prehrambene industrije za održivu proizvodnju biodizela. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 2*, str.241-258. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Dolgopyatova NV, Novikov VY, Konovalova IN, Putintsev NM: Mechanism of Acid Hydrolysis of N-Acetyl-D-glucosamine. *Russian Journal of Applied Chemistry* 86:986-991, 2013.
- Domrongpookaphan V, Khemkhao M: Calcium chloride produced from egg shell for vegetable washing, *The Journal of Applied Science* 16:1-7, 2017.
- EC, Europska komisija: Uredba Komisije (EU) br. 231/2012 od 9. ožujka 2012. o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive navedene u prilogima II. i III. Uredbi (EZ) br. 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća. Službeni list Europske unije 13(37), 2012.
- Europska komisija, EC: Uredba komisije (EU) br. 142/2011 od 25. veljače 2011. o provedbi Uredbe (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi i o provedbi Direktive Vijeća 97/78/EZ u pogledu određenih uzoraka i predmeta koji su oslobođeni veterinarskih pregleda na granici na temelju te Direktive. Službeni list Europske unije, L54:68-321, 2011.
- EZ, Europska zajednica: Uredba (EZ) br. 1069/2009 Nusproizvodi životinjskog podrijetla koji nisu namijenjeni prehrani ljudi. Službeni list Europske unije, L300:425-457, 2009.

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Compendium of Food Additive Specifications 1. FAO, 1992.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Compendium of Food Additive Specifications 4. FAO, 2006.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry* 226(1), 497-509, 1957.
- Food Additives: What is Calcium Chloride (E509) in food and its common uses, 2020. <https://foodadditives.net/firming-agent/calcium-chloride/> [3.10.2021].
- Garnjanagoonchorn W, Changpuak A: Preparation and Partial Characterization of Eggshell Calcium Chloride. *International Journal of Food Properties* 10:497-503, 2007.
- Gizatulina GA, Chebotok EN, Novikov VY, Konovalova IN: Kinetics of Acid Hydrolysis of Acetylglucosamine. *Russian Journal of Applied Chemistry* 78:791-793, 2005.
- Hincke MT, Gautron J, Nys Yves, Rodriguez-navaro AB: The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17:1266-1280, 2012.
- King'ori AM: A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. *International Journal of Poultry Science* 10:908-912, 2011.
- Liu Z, Sun X, Cai C, He W, Zhang, Linhardt RJ: Characteristics of glycosaminoglycans in chicken eggshells and the influence of disaccharide composition on eggshell properties. *Poultry Science* 5:2879–2888, 2016.
- Long FD, Adams RG, De Vore DP: Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane. US6946551B2, 2005.
- Martin-Diana AB, Rico D, Frias JM, Barat JM, Henehan GTM, Barry-Ryan C: Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: A Review. *Trends in Food Science & Technology* 18:210-218, 2007.
- Mignardi S, Archilletti L, Medeghini L, DeVito C: Valorisation of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Scientific Reports* 10:2436, 2020.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Narodne novine br. 74/08, 156/08, 2009.
- Mittal A, Teotia M, Soni RK, Mittal J: Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents. *Journal of Molecular Liquids* 223:376-387, 2016.
- Owuamanam S, Cree: Progress of Bio-Calcium Carbonate Waste Eggshell and Seashell Fillers in Polymer Composites: A Review. *Journal of Composites Science* 4(2):70, 2020.
- Primorac Lj, Flanjak I: Kontrola kakvoće hrane. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2012.

- Ray S, Barman AK, Roy PK, Singh BK: Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation Journal* 6:1-4, 2017.
- Shiferaw N, Habte L, Thenepalli T, Ahn JW: Effect of Eggshell Powder on the Hydration of Cement Paste. *Materials*, 12(15):2483, 2019.
- Stephenson FH: Solutions, Mixtures, and Media. U *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology– 3rd edition*, str. 15-42. Academic Press, London, 2016.
- Strelec I, Ostojčić M, Budžaki S: Transformacija ljuske kokošnjih jaja u proizvode dodane vrijednosti. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 3*, str. 303-327. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2021.
- Tan YY, Doh SI and Chin SC: Eggshell as a partial cement replacement in concrete development. *Magazine of Concrete Research* 70(13):662–670, 2018.
- Thakur RJ, Shaikh H, Gat Y, Waghmare RB: Effect of calcium chloride extracted from eggshell in maintaining quality of selected fresh-cut fruits. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 8:27-36, 2019.
- Tomičić K: Proizvodnja kalcijevih soli iz ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Torres-Mansilla A, Delgado-Mejía E: Influence of Separation Techniques with Acid Solutions on the Composition of Eggshell Membrane. *International Journal of Poultry Science*, 16:451-456, 2017.
- Tsai WT, Yang JM, Lai CW, Cheng YH, Lin CC, Yeh CW: Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource technology* 97:488-493, 2006.
- Vanderzant C, Splittstoesser DF: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington DC, 1992.
- Vlad V: Eggshell membrane separation method. US7584909B2, 2009.
- Waheed M, Butt MS, Shehzad A, Adzahan NM, Shabbir MA, Suleria HAR, Aadil RM: Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science & Technology* 91:219-230, 2019.
- Walton HV, Cotterill OJ, Vandepopuliere JM: Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants. *Poultry Science* 52:1836-1841, 1973.
- Wrolstand RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith D, Sporns P: Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates, Wiley-Interscience, SAD, 2005.
- Zajec M: Izolacija proteina i membrana ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2020.