

Poglavlje 12

TRANSFORMACIJA LJUSKE KOKOŠJIH JAJA U PROIZVODE DODANE VRIJEDNOSTI

Ivica Strelec*, Marta Ostojećić, Sandra Budžaki

*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska, *ivica.strelec@ptfos.hr*

SAŽETAK

Ljuska kokošjih jaja ostatak je prvenstveno poljoprivredne proizvodnje, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava, koji s obzirom na kemijski sastav predstavlja nadasve vrijednu sirovinu za proizvodnju niza različitih proizvoda dodane vrijednosti. U ovom će se poglavlju zainteresirane upoznati sa svim aspektima vezanim uz mogućnost pretvorbe ljuske jaja u proizvode dodane vrijednosti, počevši s podacima o godišnje nastalim količinama, detaljnim kemijskim sastavom ljuske jaja i njenih pojedinih strukturnih dijelova, zakonskim aktima i podaktima koji reguliraju njenu uporabu/iskorištenje te višestrukim mogućnostima transformacije u paletu čitavog niza proizvoda dodane vrijednosti.

Ključne riječi: ljuska kokošjih jaja, uporaba, membrane jaja, kalcificirani matriks, visokovrijedni proteini

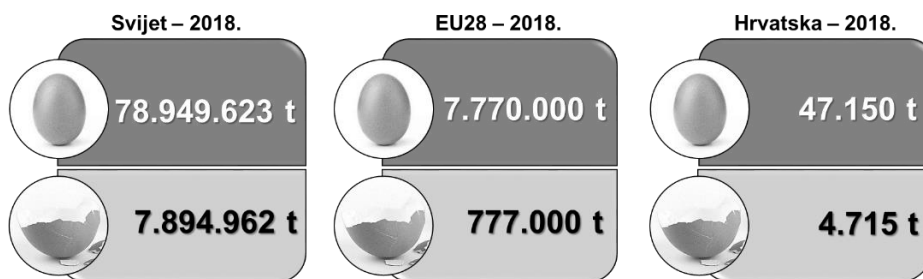
UVOD

Ljuska kokošjih jaja otpad je poljoprivredno-prehrambene, farmaceutske i biotehnološke industrije, određenih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava, čija se ukupna godišnje nastala količina može procijeniti na temelju podataka o ukupnoj masi proizvedenih kokošjih jaja te činjenice da ljuska jaja čini 10 – 11 % ukupne mase jaja (Mignardi i sur., 2020.). Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), u 2018. godini u svijetu ukupno je proizvedeno 78.949.623 t

kokošjih jaja, od čega u Europskoj uniji, uključujući i Veliku Britaniju, 7.770.000 t, a u Republici Hrvatskoj 47.150 t (FAO, 2020.).

Shodno tome, može se procijeniti da je u svijetu 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 (Slika 1). Ključno je za naglasiti da se oko 15 do 20 % od ukupno proizvedenih jaja nadalje koristi u valionicama pilića, nakon čega zaostaje ljuska jaja kao neiskorišteni dio.

Sukladno izvoru njena nastanka, nastalim količinama i zakonskoj regulativi, ljuska jaja klasificira se u dvije osnovne skupine: komunalni otpad te nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3, koji nije namijenjen prehrani ljudi. Pri tome se ljuska jaja koja je nastala kao kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata može svrstati u nekoliko podskupina komunalnog otpada, uključujući miješani komunalni otpad i biorazgradivi otpad iz kuhinja i kantina, dok ljuska jaja nastala u industriji, farmama koka nesilica, valionicama pilića te poljoprivrednim obiteljskim gospodarstvima predstavlja nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3.



Slika 1 Ukupna količina proizvedenih kokošjih jaja i procijenjena količina zaostale ljuske jaja u 2018. godini

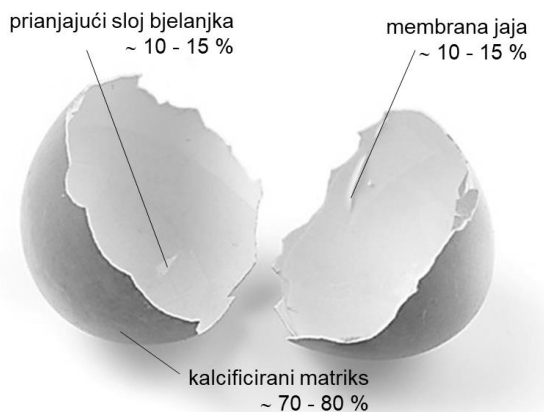
Neovisno o tome radi li se o nusproizvodu životinjskog podrijetla ili nekoj od podvrsta komunalnog otpada, glavnina ljuske jaja nažalost završava na odlagalištima otpada, sa i/ili bez nekog oblika obrade, pri čemu, osim što opterećuje okoliš, ujedno predstavlja i dodatni financijski izdatak za onoga koji ju stvara. Tako u slučaju domaćinstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata čini udio u trošku zbrinjavanja komunalnog otpada, a u slučaju industrijske proizvodnje, valionica te farmi koka nesilica u troškovima pravilnog skladištenja prije zbrinjavanja, troškovima odvoza i zbrinjavanja te troškovima dodatno propisanih naknada.

Međutim, uzmu li se u obzir podaci o kemijskom sastavu ljuske jaja, postaje jasno da ona predstavlja nadasve vrijednu sirovinu za proizvodnju čitave palete različitih proizvoda, čemu u prilog govore brojna istraživanja i patenti o mogućnosti njezine uporabe.

STRUKTURA I KEMIJSKI SASTAV LJUSKE JAJA

Ljuska se jaja strukturno gledajući može podijeliti u tri fizički različita dijela: kalcificirani matriks (tzv. prava ljuska jaja), na koji je s unutrašnje strane vezana membrana ljuske jaja (tzv. ovojnica), a na koju je prilijepljen prianjajući sloj bjelanjka zaostao nakon odvajanja bjelanjka i žumanjka od cjelovitog jajeta (Slika 2). S druge strane, ljuska jaja koja nastaje nakon kuhanja jaja ili nakon izljevanja pilića u valionicama sadrži samo dva strukturno različita dijela: kalcificirani matriks i membranu jaja.

Iako u dostupnoj literaturi ne postoje konkretni podaci o masenom udjelu pojedine strukturne komponente ljuske jaja kao otpada (kalcificirani matriks, membrana jaja, prianjajući sloj bjelanjka), na osnovi literaturnih podataka (Walton i sur., 1973.; Nakano i sur., 2003.; Thoroski, 2003.; Tsai i sur., 2006.; Baláž, 2014.; Mittal i sur., 2016.; Ray i sur., 2017.; Waheed i sur., 2019.; Réhault-Godbert i sur., 2019.; Mignardi i sur., 2020.; Zajec, 2020.; Tomičić, 2020.) može se procijeniti da kalcificirani matriks ljuske jaja čini između 70 i 80 % od ukupne mase ljuske jaja, a membrana jaja i prianjajući sloj bjelanjka svaki između 10 i 15 % na bazi mase vlažne tvari ljuske jaja (Slika 2). Ova se masena razdioba komponentata naravno mijenja u slučaju kada ljusku jaja čine samo kalcificirani matriks i membrana jaja, i to povećavajući se na račun prianjajućeg sloja bjelanjka.



Slika 2 Struktura i raspon udjela pojedinih strukturnih komponenti ljuske jaja

Kada govorimo o kemijskom sastavu ljuske jaja, potrebno je napomenuti da se glavnina istraživanja usmjerenih na određivanje kemijskog sastava bazira na analizi sastava ljuske s koje je uklonjen prianjajući sloj bjelanjka tijekom procesa pripreme/ispiranja ljuske jaja za analizu, a isprana ljuska suši se određeno vrijeme. Na temelju takve pripreme ne može se dobiti uvid u realan prosječni kemijski sastav ljuske jaja kao „otpada”, što djelomično otežava planiranje u slučaju kada se ljuska jaja, kao nusproizvod životinjskog podrijetla ili kao komunalni otpad, želi iskoristiti kao sirovina za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti. Izuzetak tomu čine istraživanja Waltona i sur. (1973.) koji su ispitali kemijski

sastav ljuske jaja kao otpada iz tvornica za preradu jaja, Zajeca (2020.) koji je ispitaio udio suhe tvari u ljusci jaja i udio proteina u prijanjajućem sloju bjelanjka ljuske jaja prikupljene iz domaćinstava i restorana, te Tomičić (2020.) koja je u ljusci jaja prikupljenoj iz domaćinstava i restorana, uz udio vlage, ispitala i udio kalcijeva karbonata.

Sukladno podacima gore navedenih istraživanja, ljuska jaja sadrži između 16 i 30 % vode, pri čemu prosječni udio vode u ljusci jaja koja nastaje u tvornicama za preradu jaja iznosi 29,1 %, a ljusci jaja nakon centrifugalne separacije prijanjajućeg sloja bjelanjka jaja 16,2 % (Walton i sur., 1973.). U svježoj ljusci jaja koja sadrži prijanjajući sloj bjelanjka udio vode iznosi 21,2 %, a u ljusci prikupljenoj iz restorana i domaćinstva 16,5 % (Tomičić, 2020.; Zajec, 2020.). Ovo upućuje na to da prilikom bilo kakvog planiranja mogućnosti uporabe/iskorištenja ljuske jaja, treba voditi računa o izvoru njena nastanka i/ili manipulaciji nakon nastanka.

Kalcijev karbonat najzastupljenija je komponenta ljuske jaja, čiji se udio na bazi suhe tvari ljuske jaja kreće u rasponu od 88 do 92 % za ljusku jaja s prijanjajućim slojem bjelanjka te u rasponu od 89 do 94 % za ljusku jaja s koje je ispiranjem uklonjen prijanjajući sloj bjelanjka (Walton i sur., 1973.; Tomičić, 2020.). Štoviše, uzme li se u obzir da membrana ljuske jaja čini oko 3 % mase suhe tvari ljuske jaja (Zajec, 2020.), može se zaključiti da je udio kalcijeva karbonata u kalcificiranom matriksu ljuske jaja još veći te se kreće u rasponu od 92 pa čak do 97 %. Još jedna od relativno zastupljenijih komponenti ljuske jaja su proteini. Udio proteina u ljusci jaja na bazi suhe tvari iznosi 7,56 % za ljusku jaja s prijanjajućim slojem bjelanjka (Walton i sur., 1973.) te između 3,92 i 5,63 % za ljusku jaja s koje je ispran prijanjajući sloj bjelanjka (Walton i sur., 1973.; Ray i sur., 2017.; Waheed i sur., 2019.). Uzme li se u obzir da membrane jaja čine oko 3 % mase suhe tvari ljuske jaja te da sadrže oko 89 % proteina (*podaci naše istraživačke skupine*), a da proteini prijanjajućeg sloja bjelanjka čine između 1,61 i 2,41 % mase ljuske jaja na bazi suhe tvari (Walton i sur., 1973.; Zajec, 2020.), može se procijeniti da su proteini gotovo podjednako zastupljeni u sva tri fizička dijela ljuske jaja: kalcificiranom matriksu, membrani jaja i prijanjajućem sloju bjelanjka. Ostale komponente ljuske jaja prisutne su u količinama nižim od 1 % na bazi suhe tvari, a uključuju magnezij (0,29 – 0,36 %) i masti (0,08 – 0,35 %), dok su fosfor, natrij i kalij prisutni u količinama nižim od 0,07 % (Walton i sur., 1973.; Ray i sur., 2017.; Waheed i sur., 2019.).

Kemijski sastav kalcificiranog matriksa ljuske jaja

Kalcificirani matriks ljuske jaja, odnosno „*prava ljuska jaja*” prirodna je porozna biokeramika izgrađena od kalcijevog karbonata u obliku kristala kalcita pomiješanih s organskim materijalom ljuske jaja. Glavninu sastava kalcificiranog matriksa ljuske jaja čini kalcijev karbonat, čiji se udio kreće u rasponu od 92 do 97 %, dok ostatak čine proteini (2 – 5 %), kalcijev fosfat (1 %), magnezijev karbonat (1 %) te ugljikohidrati, lipidi i elementi u

tragovima (Hincke i sur., 2012.; Waheed i sur., 2019.; Mignardi i sur., 2020.; Mittal i sur., 2016.; Arabhosseini i Faridi, 2018.; Tsai i sur., 2006.). Pri tome je ključno naglasiti da se ugljikohidratna komponenta prvenstveno nalazi vezana za proteinska vlakna matriksa, a prema Nakano i sur. (2003.) sadrži značajne količine uronske i sijalinske kiseline i kondroitin-sulfata.

Kemijski sastav membrane jaja

Membrana jaja smještena je s unutrašnje strane kalcificiranog matriksa ljuske jaja (Slika 2), i može se podijeliti na tri dijela: vanjsku, unutrašnju i graničnu membranu. Vanjska membrana nalazi se neposredno uz kalcificirani matriks s kojim je čvrsto povezana uranjanjem proteinskih vlakana u mamilarni sloj kalcificiranog matriksa. Na vanjsku membranu naslanja se unutrašnja membrana, a na nju se nastavlja vrlo tanki sloj granične membrane, koja zapravo stupa u dodir s bjelanjkom jaja (Baláž, 2014.; Zajec, 2020.). Sve ove membrane zapravo predstavljaju trodimenzionalnu mrežu unakrsno povezanih proteinskih vlakana uronjenih u smjesu glikozaminoglikana i proteoglikana. Shodno tome, ne začuđuje činjenica da su upravo proteini i glikozaminoglikani glavni sastojci membrana jaja (Long i sur., 2005.; Baláž, 2014.; Mittal i sur., 2016.).

Sukladno navodima Mittal i sur. (2016.), ukupni proteini čine oko 60 % mase membrana jaja, od čega kolagen čini oko 35 % od ukupnih proteina, dok se u ostatku proteinske frakcije membrana jaja (65 %) mogu pronaći značajne količine glikozaminoglikana, od čega glukozamin čini 10 %, kondroitin 9 %, a hijaluronska kiselina 5 %. S druge strane, Baláž (2014.) navodi da proteini čine od 80 do 85 % membrane jaja, od čega 10 % čine kolagenska vlakna (tip I, V i X), a ostatak proteini i glikoproteini, pri čemu je autor očito glikoproteinskoj frakciji pribrojao i glikozaminoglikane. Da glikozaminoglikani čine značajan dio mase membrana jaja, upućuju i podaci patenta US6946551B2 (Long i sur., 2005.), u kojem se navodi da udio hijaluronske kiseline u membrani jaja iznosi od 5 do 10 %, dok heksozami (*N*-acetilglukozamin, *N*-acetilgalaktozamin, ostale aminirane heksoze) čine do 5 % mase membrane jaja, a kondroitin sulfat oko 5 %. Uz proteine i glikozaminoglikane, membrane jaja sadrže i male količine lipida čiji udio u membranama iznosi oko 2,7 % (King'ori, 2011.). Kada se govori o udjelu vode u membranama jaja, potrebno je napomenuti da u dostupnoj literaturi postoje poprilično različiti podaci. Tako King'ori (2011.) navodi da membrana jaja sadrži oko 1,5 % vode, dok podaci Vlada (2009.), Zajeca (2020.) i preliminarni podaci naše istraživačke grupe upućuju na udio vode u rasponu od 3 do 9 %, što se može pripisati razlikama u načinu proizvodnje membrana jaja, kao i temperaturi i vremenu sušenja membrana prije analize. Međutim, koliki je stvaran udio vode u membrani, svježe odvojenoj od ljuske jaja, ovisit će o načinu njena odvajanja, tj. radi li se o suhom ili mokrom postupku odvajanja. Preliminarni podaci naše istraživačke grupe upućuju da je masa svježe odvojenih membrana od ljuske jaja s koje je prethodno ispran prijanjajući sloj bjelanjka (mokri postupak) oko 5 – 7 puta veća od mase osušenih

membrana. U prilog tomu govore i podaci Zajeca (2020.) koji je pronašao da suhe membrane jaja (~ 93,6 % suhe tvari) pokazuju velik kapacitet vezanja vode, koji se kreće u rasponu od 6,5 do 8,5 mL vode po 1 g membrana.

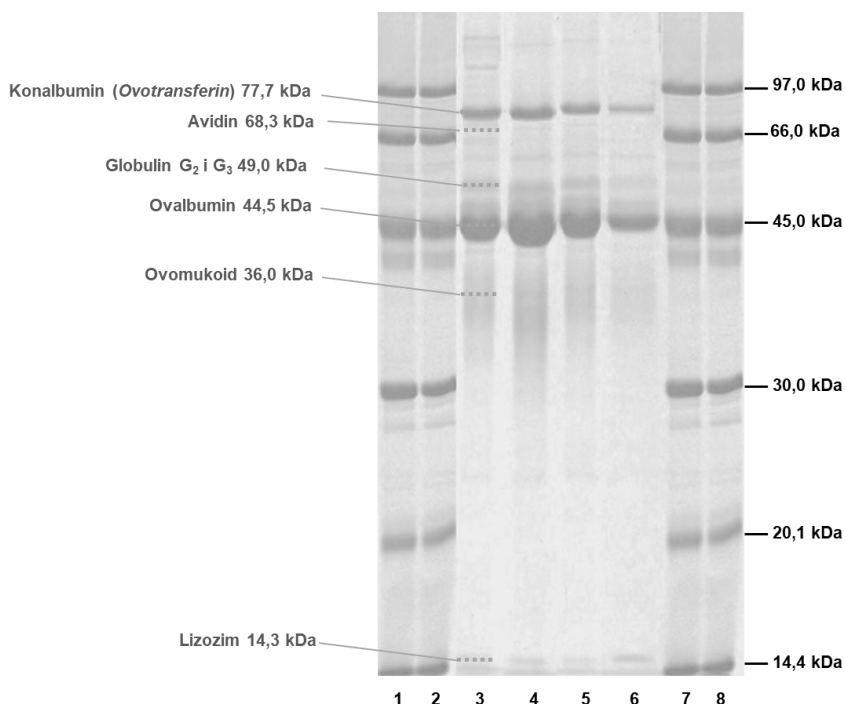
Kemijski sastav prijanjajućeg sloja bjelanjka

Iako u dostupnoj literaturi ne postoje konkretni podaci o kemijskom sastavu prijanjajućeg sloja bjelanjka, njegov se kemijski sastav može procijeniti na osnovi podataka o kemijskom sastavu bjelanjka jaja. Bjelanjak sadrži oko 88 % vode i 11 % proteina, dok ostatak do 1 % čine ugljikohidrati, lipidi i mineralne tvari (Alleoni, 2006.; Abeyrathne i sur., 2013.; Réhault-Godbert i sur., 2019.). Uzimajući u obzir činjenicu da ljuska jaja prikupljena kao otpad iz restorana i domaćinstava sadrži nešto niži udio vode od svježe ljuske jaja (Tomičić, 2020.; Zajec, 2020.), za očekivati je da će udio proteina i ostalih komponenti (ugljikohidrati, lipidi i mineralne tvari), u prijanjajućem sloju bjelanjka tako prikupljenih ljuski jaja, biti nešto viši od literaturno utvrđenih podataka.

Bjelanjak jaja uz značajnu je nutritivnu vrijednost, uz dobro poznat utjecaj na svojstva poput želatinizacije, emulzifikacije i stabilizaciju pjenjenja tijekom proizvodnje prehrambenih proizvoda, naišao na značajnu uporabu kao sirovine za proizvodnju pročišćenih proteina, poput lizozima, ovalbumina i ovotransferina, čiji prosječni udio u ukupnim proteinima bjelanjka jaja iznosi kako slijedi: ovalbumin čini oko 54 % ukupnih proteina bjelanjka, ovotransferin oko 12 %, a lizozim oko 4 % (Miguel i sur., 2005.; Alleoni, 2006.; Abeyrathne i sur., 2013.; Silvetti i sur., 2017.; Réhault-Godbert i sur., 2019.; Zajec, 2020.). Shodno tome, može se očekivati i da prijanjajući sloj bjelanjka ljuske jaja sadrži podjednaku količinu navedenih proteina.

Potvrdu da su proteini prijanjajućeg sloja bjelanjka identični onima koji se nalaze u bjelanjku pokazuju rezultati SDS-PAGE analize proteinskog profila proteina ekstrahiranih s ljuske jaja kao otpada i proteina bjelanjka, a koju je provela naša istraživačka grupa (Slika 3).

Na temelju prethodno navedenih podataka o strukturi i kemijskom sastavu ljuske jaja, evidentno je da ljuska jaja predstavlja nadasve vrijedan izvor kalcija, visokovrijednih proteina te glikozaminoglikana, koji bi se primjenom odgovarajućih tehnoloških postupaka mogli izdvojiti iz ljuske jaja i slijedno plasirati na tržište kao proizvodi dodane vrijednosti. Međutim, za bilo koji oblik uporabe/iskorištenja ili transformacije ljuske jaja u tržišno dostupne proizvode neophodno je pridržavati se Zakonske regulative.



Slika 3 SDS-PAGE proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja
 Stupci: 1, 2, 7, 8 – proteini standardi molekulske mase u rasponu do 14,4 do 97,0 kDa;
 3 – proteini prijanjajućeg sloja bjelanjka svježe ljuske jaja; 4 – proteini prijanjajućeg sloja
 bjelanjka ljuske jaja skladištene 7 dana pri +4 °C; 5 – proteini prijanjajućeg sloja bjelanjka
 ljuske jaja skladištene 90 dana pri -20 °C; 6 – proteini bjelanjka jaja

ISKORIŠTENJE LJUSKE JAJA I ZAKONSKA REGULATIVA

Postupanje s ljuskom jaja koja nastaje kao „*otpad*“ iz različitih izvora propisano je nizom zakonskih akata i podakata, smjernica, uputa i preporuka, od kojih među najznačajnije spadaju: 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.), 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.), Zakon o održivom gospodarenju otpadom (Hrvatski sabor, 2019.), Pravilnik o nusproizvodima životinjskog porijekla koji nisu za prehranu ljudi (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2009.), Pravilnik o katalogu otpada (Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, 2015.), Pravilnik o vrstama otpada (Državna uprava za zaštitu okoliša, 1996.), Katalog otpada (Ministarstvo zaštite okoliša i prirode, 2013.), Upute i pojmovnik za određivanje otpada prema katalogu otpada (Agencija za zaštitu

okoliša, 2010.) te smjernice vezane uz Sprječavanje nastanka otpada od hrane prilikom obavljanja turističko-ugostiteljske djelatnosti (Agencija za zaštitu okoliša, 2014.).

U doba globalne konkurentnosti i u želji za ostvarenjem dodatne profitabilnosti u pogledu iskorištenja ljuske jaja kao sirovine za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti, čini se poprilično teško i obeshrabrujuće snaći se u „šumi“ zakonskih akata, podakata, uputa i smjernica. Međutim, na temelju detaljne analize gore navedene zakonske regulative, može se zaključiti slijedeće:

- ljuska jaja koja zaostaje nakon industrijske proizvodnje (farme jaja, valionice pilića, tvornice za preradu jaja, poljoprivredna obiteljska gospodarstva koja se bave proizvodnjom jaja, prehrambena, farmaceutska i biotehnološka industrija) načelno se može iskoristiti za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti, i
- ljuska jaja koja zaostaje kao rezultat djelatnosti u ugostiteljskim objektima (restorani, kantine, slastičarne), malim obrtima te domaćinstvima ne može se iskoristiti kao odvojena sirovina, već samo u sastavu otpada u okviru kojega nastaje (komunalni otpad) za proizvodnju komposta ili bioplina od strane registriranog oporabitelja.

U slučaju ljuske jaja koja preostaje u industriji pod pojmom „*načelno iskoristiti*“, podrazumijeva se korištenje ljuske jaja kokoši koje nisu pokazivale kliničke znakove bilo koje bolesti, ali isto tako i jaja koja nisu pokazivala znakove kontaminacije patogenim mikroorganizmima, a koje bi se preko „*novih*“ proizvoda mogle prenijeti na ljude ili životinje. Pritom je potrebno naglasiti da mogućnost uporabe ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla mora biti propisana od strane nadležnog tijela, odnosno Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane pri Ministarstvu poljoprivrede, a sve u svrhu kako bi se spriječila pojava rizika za javno zdravlje i zdravlje životinja. S druge strane, u slučaju zaraze koka nesilica ili jaja, propisani je postupak s jajima, kao i eventualno zaostalom ljuskom jaja, spaljivanje.

Brojna znanstvena istraživanja usmjerena prema mogućnosti uporabe ljuske jaja kao otpada/nusproizvoda ukazuju da bi se ljuska jaja prikupljena iz restorana i studentskih kantina mogla iskoristiti kao visokovrijedna sirovina za proizvodnju čitavog niza različitih proizvoda, iako je to u suprotnosti s postojećom zakonskom regulativom. Naime, ljuska se jaja iz ovih izvora, sukladno regulativi, može svrstati u komunalni otpad, tj. biorazgradivi otpad iz kuhinja i kantina i miješani komunalni otpad biootpad, koji se zapravo prerađuje u kompost ili se može iskoristiti u energetske postrojenjima. Pritom se biootpad definira kao biološki razgradiv otpad iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata i sličan otpad iz proizvodnje prehrambenih proizvoda; biološki razgradiv otpad kao otpad koji se može razgraditi biološkim aerobnim i anaerobnim postupkom; biorazgradivi komunalni otpad kao otpad nastao u kućanstvu i otpad koji je po prirodi i sastavu sličan otpadu iz kućanstva, osim proizvodnog otpada i otpada iz poljoprivrede, šumarstva, a koji u svom sastavu sadrži

biološki razgradiv otpad (Zakon o održivom gospodarenju otpadom, (Hrvatski sabor, 2019.). Za sada ne postoji zakonska regulativa koja bi omogućila da se ljuska jaja nastala u ugostiteljskim objektima (studentske kantine, restorani), i to posebice onima koji proizvode značajne količine, zasebno izdvaja i okarakterizira kao nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3 te koristi za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti. No, čini se da bi se, nakon prikupljanja dostatnog i relevantnog broja znanstvenih podataka, ona mogla u budućoj zakonskoj regulativi izdvojiti/označiti kao pogodna sirovina za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti.

Ljuska jaja koja se klasificira kao nusproizvod životinjskog podrijetla nije namijenjena 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. Pri tome se, sukladno članku 14., točki h) Uredbe (EZ) br. 1069/2009, mora koristiti pod uvjetima koje je propisalo nadležno tijelo (Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane pri Ministarstvu poljoprivrede), a sve u svrhu sprječavanja pojava rizika za javno zdravlje i zdravlje životinja. S druge strane, ljuska se jaja isto tako može iskoristiti i za proizvodnju sirovina za kozmetičke proizvode, aktivne medicinske proizvode za usađivanje, određene medicinske proizvode, *in vitro* dijagnostička medicinska pomagala te veterinarsko-medicinske proizvode koji, sukladno članku 14., točki j) Uredbe (EZ) br. 1069/2009, podliježu drugim uredbama Europske zajednice, a koje su vezane uz navedene klase proizvoda. Nadalje, ljuska se jaja, sukladno članku 14., točki j) te članku 36. Uredbe (EZ) br. 1069/2009, može iskoristiti i za proizvodnju drugih vrsta proizvoda koji osiguravaju kontrolu rizika za javno zdravlje i zdravlje životinja, od čega je svakako potrebno istaknuti mogućnost uporabe ljuske jaja u proizvodnji proizvoda/sirovina za potrebe farmaceutske industrije, uključujući kolagen, hijaluronsku kiselinu, kondroitin sulfat, kao i ostale skupine visokovrijednih glikoziaminoglikana. Pri tome ocjenu rizika, ovisno o vrsti nusproizvoda životinjskog podrijetla, donosi Europska agencija za sigurnost hrane, Europska agencija za lijekove ili Znanstveni odbor za proizvode široke potrošnje. Uz sve dosad navedene mogućnosti uporabe ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla kategorije 3, svakako je potrebno izdvojiti i naglasiti da se ljuska jaja, neovisno o Uredbi (EZ) br. 1069/2009, ipak pod posebnim uvjetima prerade, uz pozitivno mišljenje Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), može iskoristiti i za proizvodnju proizvoda za prehranu ljudi. Na to ukazuje Provedbena uredba komisije (EU) 2018/1647 (EU, 2018) kojom je hidrolizat jajne ovojnice (membrane jaja) u obliku praha, a koji je dobiven iz kokošje ljuske jaja, uključen u listu odobrene nove hrane.

Sukladno članku 4. Uredbe (EZ) br. 1069/2009, odmah nakon nastanka nusproizvoda životinjskog podrijetla, što uključuje i ljusku jaja, iste se mora pravilno označiti i osigurati te njima pravilno postupati. Nusproizvodima životinjskog podrijetla i od njih dobivenim proizvodima u registriranim tehnološkim objektima ili pogonima u svim fazama proizvodnje i manipulacije (sakupljanja, prijevoza, postupanja, obrade, pretvorbe, prerade, skladištenja,

stavljanja na tržište, distribucije, uporabe i odlaganja), potrebno je postupati sukladno navedenoj Uredbi. Na ljusku se jaja, kao nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3, prvenstveno primjenjuju odredbe članka 14. Uredbe (EZ) br. 1069/2009, kojim se ljuska jaja može: a) odložiti kao otpad spaljivanjem, uz prethodnu preradu ili bez nje, pri čemu se očigledno podrazumijeva da se ljuska jaja neće dalje iskorištavati, što se isto tako može pretpostaviti i za sljedeće dvije točke istog članka gdje se ljuska jaja može b) preraditi ili odložiti suspaljivanjem, uz prethodnu preradu ili bez nje, ili c) odložiti na odobreno odlagalište nakon prerade. U velikoj većini slučajeva vezanih uz mogućnost uporabe ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla očekuje se da će ona biti prethodno prerađena jednom od propisanih metoda navedenih u poglavlju III. priloga IV. Uredbe Komisije (EU) br. 142/2011. S druge strane, ljuska se jaja u svrhu proizvodnje proizvoda dodane vrijednosti može obraditi i alternativnim metodama obrade, uz prethodno odobrenje nadležnog tijela (Uredba Komisije (EU) br. 142/2011. i/ili Uredba (EZ) br. 1069/2009). U pogledu mogućnosti uporabe ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla, mogu se primijeniti i odredbe odjeljka 9., poglavlja III., priloga X. Uredbe Komisije (EU) br. 142/2011., koja se odnosi na posebne zahtjeve za proizvode od jaja, uključujući i ljusku jaja, a shodno točki c) istoimenog odjeljka s ljuskom jaja može se postupati u skladu sa zahtjevima za jaja i proizvode od jaja iz poglavlja I., II. i III. odjeljka X. Priloga III. Uredbe (EZ) br. 853/2004 (EZ, 2004.).

Iz svega gore navedenog, očigledno je da se ljuska jaja kao nusproizvod životinjskog podrijetla, uz primjenu niza zakonskih akata i podakata, zapravo može uporabiti za proizvodnju čitavog niza različitih visokovrijednih proizvoda.

TRANSFORMACIJA LJUSKE JAJA U PROIZVODE DODANE VRIJEDNOSTI

Bilo kakav oblik iskorištenja ljuske jaja koji namjesto odlaganja na odlagališta rezultira nastankom nekog novog proizvoda, može se definirati kao proces transformacije ljuske jaja u proizvod dodane vrijednosti. Pri tome transformacija ljuske jaja primjenom osnovnih tehnologija prerade može rezultirati proizvodima poput komposta, hrane za životinje ili digestata za biopliniska postrojenja, dok primjenom novih naprednih tehnologija proizvodima poput kemikalija, finih kemikalija, aditiva, dodatka prehrani, farmaceutskih, nutritivnih i veterinarsko-medicinskih proizvoda, enzima ili različitih funkcionalnih materijala.

Proizvodnja visokovrijednih proizvoda vrlo često zahtjeva alternativne metode obrade ljuske jaja kojima bi se otklonila bilo kakva pojava rizika za javno zdravlje i zdravlje životinja, pri čemu je za primjenu istih potrebno ishoditi dozvolu od nadležnog nacionalnog tijela te, dugoročno, nekih od tijela Europske unije, poput Europske agencije za sigurnost hrane, Europske agencije za lijekove ili Znanstvenog odbora za proizvode široke potrošnje.

Najčešći je početni korak u iskorištenju ljuske jaja kao „otpada” za proizvodnju visokovrijednih proizvoda transformacija po strukturi, pri čemu se iz ljuske jaja, ovisno o izvoru njena nastanka, mogu dobiti dva ili tri različita proizvoda, a koji se potom mogu iskoristiti kao sirovina za proizvodnju novih proizvoda dodane vrijednosti.

Transformacija ljuske jaja po strukturi

Ljuska jaja koja nastaje kao „otpad” u tvornicama za preradu jaja, farmama za proizvodnju jaja ili u ugostiteljskim objektima (studentske kantine, restorani), može se transformirati u tri različita proizvoda:

- bjelanjak i/ili otopinu proteina bjelanjka,
- membranu jaja,
- kalcificirani matriks ljuske jaja.

Ljuska jaja koja nastaje kao „otpad” u valionicama pilića može dati dva strukturno različita proizvoda: membranu jaja i kalcificirani matriks ljuske jaja. Ljusku jaja koja nastaje kao nusproizvod u valionicama potrebno je prethodno izdvojiti od ostalih nusproizvoda koji nastaju tijekom izlijeganja pilića. Odvajanje ljuske jaja od ostalih nusproizvoda u valionicama može se postići primjenom usisnog vakuuma, uslijed kojeg ljuska jaja kao lakša komponenta biva zračno odvojena/usisana od ostatka valioničkog otpada, kako je to opisano u patentu US6899294B2 (MacNeil, 2005.).

Prianjajući sloj bjelanjka, a time i visokovrijedni proteini bjelanjka, mogu se od ljuske jaja odvojiti centrifugalnom separacijom (Glatz i sur., 2011.; Thoroski, 2003.; Walton i sur., 1973.) i/ili ispiranjem ljuske jaja vodom (Zajec, 2020.; Walton i sur., 1973.), pri čemu se potpunije izdvajanje proteina bjelanjka upravo postiže ispiranjem vodom. Jedan od ključnih nedostataka ovako izdvojenog materijala činjenica je da zbog visokog sadržaja vode i hranjivog sastava predstavlja nadasve pogodnu podlogu za razvoj mikroorganizama te se njime trebati vrlo oprezno postupati i na njega odmah primijeniti određene postupke u svrhu sprječavanja daljnjeg razvoja mikrobne populacije. Tako se u slučaju prianjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja, proizvedenog centrifugalnom separacijom iz ljuske jaja kao nusproizvoda tvornica za preradu jaja, može primijeniti postupak čuvanja pri +4 °C tijekom 2 dana ili pri -20 °C tijekom 21 dana te nakon toga obavezna prerada. S druge strane, u slučaju otopina proteina bjelanjka dobivenih ispiranjem ljuske jaja kao „otpada” iz različitih izvora (tvornice za preradu jaja, farme za proizvodnju jaja, studentske kantine, restorani), najizgledniji postupak bio bi filtracija kroz seriju od 3 do 4 filtera različitih veličina pora (od 34 do 0,22 µm), pri čemu bi se krajnjom filtracijom kroz filter veličine pora 0,22 µm mogla dobiti sterilna otopina proteina bjelanjka kao proizvod. Upravo zbog gore navedenog ne čudi činjenica da većina znanstvenih istraživanja i patenata, usmjerenih na mogućnost iskorištenja ljuske jaja kao „otpada”, prianjajući sloj bjelanjka i/ili njegove proteine ne iskorištava, već ih odbacuje u otpadnoj vodi koja nastaje nakon ispiranja ljuske jaja vodom. Na ovakav se način nažalost gube visokovrijedni proteini bjelanjka, poput ovalbumina,

ovotransferina, lizozima i drugih (Abeyrathne i sur., 2013.), a koji na tržištu kemikalija, ovisno o tome o kojem se proteinu radi kao i stupnju njegove čistoće, mogu postići cijenu od 136 eura za 1 kg, pa čak do vrtoglavih 1940 eura za 5 g (Tablica 1). Na potencijal iskorištenja otopina proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka upućuju i istraživanja Zajeca (2020.) koji je ustanovio da se iz ljuske jaja kao otpada prikupljenog iz domaćinstava i restorana, može vodom izdvojiti oko 16,2 g ukupnih proteina bjelanjka po 1 kg ljuske jaja, pri čemu prosječna aktivnost antimikrobnog enzima lizozima iznosi oko 4585 internacionalnih jedinica (U) po 1 g ljuske jaja. Sve to upućuje na to da se prijanjajući sloj bjelanjka ipak ne bi trebalo tako olako odbacivati.

Tablica 1 Tržišne cijene pročišćenog ovalbumina, ovotransferina i lizozima iz bjelanjka jaja

Protein	Stupanj čistoće	Cijena po najvećem pakiranju	Izvor
Ovalbumin (<i>sinonim: albumin</i>)	62 – 88 % ≥ 90 % ≥ 98 %	136 euro/1 kg 1340 euro/50 g 2040 euro/50 g	Sigma-Aldrich a), 2021.
Ovotransferin (<i>sinonim: konalbumin</i>)	≥ 98 %	1940 euro/5 g	Sigma-Aldrich b), 2021.
Lizozim	≥ 90 % ≥ 98 %	2440 euro/100 g 445 euro/5 g	Sigma-Aldrich c), 2021.

Nakon uklanjanja prijanjajućeg sloja bjelanjka, ljuska jaja sadržava dvije strukturne komponente: kalcificirani matriks i membranu jaja. Postupak razdvajanja ove dvije strukturne komponente ljuske jaja najčešće se provodi na temelju razlike u gustoći membrana i kalcificiranog matriksa, pri čemu prosječna gustoća kalcificiranog matriksa ljuske jaja iznosi 2,532 g/cm³, a membrana jaja gotovo upola manje, tj. prosječno 1,358 g/cm³ (Tsai i sur., 2006.). Ovakva razlika u gustoći omogućuje fino odjeljivanje usitnjenih čestica membrana od kalcificiranog matriksa, bilo u struji zraka (pneumatsko razdvajanje), bilo u tekućini (diferencijalna flotacija), pri čemu se kao početni korak odvajanja vrlo često koristi usitnjavanje suhe ljuske jaja (pneumatsko razdvajanje) ili smjese ljuske jaja i vode (diferencijalna flotacija). Tako Thoroski u patentu US6649203B1 (2003.) navodi mogućnost iskorištenja ljuske jaja kao nusproizvoda tvornica za preradu jaja, pri čemu nakon početnog odvajanja prijanjajućeg sloja bjelanjka centrifugalnom separacijom i slijedno ispiranjem vodom, ljusku jaja podvrgava sušenju u bubnju za sušenje, pri čemu postiže primarno usitnjavanje ljuske jaja i djelomično odvajanje

membrana jaja od kalcificiranog matriksa. Nakon toga postupak separacije nastavlja odjeljivanjem oslobođenih dijelova membrana od kalcificiranog matriksa na vibracijskim sitima, dok se zaostala ljuska jaja usmjerava u mlin čekićar, u svrhu daljnjeg usitnjavanja i raskidanja veza između kalcificiranog matriksa i membrana jaja. Slijedno odvajanje membrana jaja od kalcificiranog matriksa postiže se pneumatski, tj. primjenom podtlaka kojim se, iz fino usitnjene smjese ljuske jaja, membrane jaja zbog niže gustoće uzlaznom strujom zraka odvajaju od težih čestica kalcificiranog matriksa. Nešto drugačiji, no ipak sličan postupak odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa ljuske jaja, navodi MacNeil u svom patentu US6899294B2 (2005.). Pritom se predlaže postupak iskorištenja ljuske jaja nastale kao nusproizvod u tvornicama za proizvodnju jaja, kao i ljuske jaja iz valioničkog „otpada“. Za izdvajanje ljuske jaja iz valioničkog otpada, MacNeil predlaže primjenu podtlaka, odnosno usisne struje zraka koja ljusku jaja, kao lakšu komponentu, povlači iz valioničkog otpada i potom usmjerava u spremnik u kojem se tako izdvojena ljuska jaja ispire vodom, dezinficira te potom usmjerava na sušenje. S druge strane, u slučaju ljuske jaja koja nastaje u tvornicama za preradu jaja, MacNeil predlaže gotovo identične postupke obrade (centrifugalna separacija, ispiranje ljuske jaja) kao i Thoroski (2005.). Neovisno o izvoru ljuske jaja, MacNeil nakon provedenog sušenja predlaže mljevenje na veličinu čestica do 0,1 do 15 mm, pri čemu tijekom procesa mljevenja ujedno dolazi i do fizičkog odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa. Po provedenom postupku mljevenja, odvajanje membrana od kalcificiranog matriksa uključuje dvojni proces razdvajanja, pri čemu se početni proces razdvajanja membrana i kalcificiranog matriksa postiže na pokretnoj vibracijskoj traci tipa sita, da bi se nakon toga zaostala smjesa ljuske jaja dozirala u ciklon s uzlaznom strujom zraka (nadtlak), pri čemu teže čestice (kalcificirani matriks) padaju na dno ciklona, a lakše čestice (membrana jaja) odnose u struji zraka i skupljaju bilo u vrećici ili talože u sljedećem ciklonu. Za razliku od gore opisanog postupka „zračnog odvajanja“, MacNeil je još 2001. patentom US6176376B1 predložio postupak odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa ljuske jaja primjenom diferencijalne flotacije. Predloženi postupak zasniva se na razlici gustoće usitnjenih čestica membrana i kalcificiranog matriksa ljuske jaja u vodi, pri čemu čestice kalcificiranog matriksa zbog veće gustoće padaju na dno spremnika za diferencijalnu flotaciju, a membrane koje su lakše plutaju u vodi te se ispumpavanjem iz spremnika odvajaju od ljuske jaja. Samom postupku odvajanja prethodi usitnjavanje ljuske jaja na veličinu čestica između 0,1 i 4 mm, prilikom kojeg se postiže slabljenje veza između membrana i kalcificiranog matriksa ljuske jaja. Samljevena smjesa se potom dozira u spremnik s vodom te se, uz konstantno miješanje turbulentnim strujanjem, postiže odvajanje membrana od kalcificiranog matriksa. Inačicu razdjeljivanja membrana od ljuske jaja na temelju diferencijalne flotacije predložili su Yoo i sur. (2009.), koji koriste turbulentno strujanje izazvano protokom vode s uklopljenim mjehurićima zraka. Sukladno ovoj metodi, ljuska se jaja u prisutnosti vode prvo usitni u suspenziju te se potom dozira u spremnik s vodom, u koji se s dna uvodi voda obogaćena mjehurićima zraka (zrak pod tlakom od 275 kPa, protok od 189 L/h). Uslijed djelovanja turbulentnog strujanja i mjehurića zraka, membrana jaja dodatno se odvaja od

kalcificiranog matriksa te, nošena strujom, izdvaja na vrhu spremnika, dok teže čestice kalcificiranog matriksa padaju na dno spremnika. Još jedan od načina odjeljivanja membrana od ljuske jaja primjenom diferencijalne flotacije, predložen je patentom US20090206009A1 (Flohr i Jalfen, 2009.), a koji je predviđen za kontinuirani proces razdjeljivanja. Postupak razdjeljivanja započinje mljevenjem ljuske jaja u prisutnosti vode na veličinu čestica u rasponu od 0,5 do 2,5 mm, nakon koje se suspenzija dozira u uređaj za separaciju s pliticama u protustruji. Pritom kalcificirani matriks zbog veće specifične težine pada prema dnu uređaja te se taloži na dnu i/ili na najdonjim pliticama, a membrane jaja kao lakše plutaju u vodi i odvajaju se u gornjim pliticama uređaja. Dodatno odvajanje membrana od kalcificiranog matriksa ljuske jaja u mljevenoj suspenziji pospješeno je uzlaznim strujanjem vode, kao i uporabom drugog spremnika s pliticama, u kojem dolazi do potpunog odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa istaloženog na dno prvog uređaja za separaciju i prenesenog u drugi spremnik. Unaprijeđenje postupka odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa ljuske jaja diferencijalnom flotacijom predlaže Vlad (2009.) patentom US7584909B2, u kojem se koristi kombinirani utjecaj miješanja, ultrazvuka i djelovanja razblažene otopine octene kiseline. Miješanje ljuske jaja u otopini 2,5 % octene kiseline omogućuje kidanje veza između membrana jaja i kalcificiranog matriksa uslijed djelomičnog otapanja kalcijeva karbonata, što je dodatno pospješeno primjenom ultrazvuka. Iako navedena metoda razdvajanja predstavlja napredak u odvajanju membrana i kalcificiranog matriksa ljuske jaja, jedan je od ključnih nedostataka ove metode zanemarivanje potencijalnog iskorištenja nastalog kalcijeva acetata. Naime, izlaganje kalcijeva karbonata, koji je sadržan u kalcificiranom matriksu ljuske jaja, octenoj kiselini dovodi do kemijske reakcije u kojoj nastaje kalcijev acetat (Tomičić, 2020.), što predloženim patentom uopće nije predviđeno, kao ni daljnje iskorištenje vodene otopine nastalog kalcijeva acetata.

Uz sve gore navedene mogućnosti strukturnog odvajanja membrana od kalcificiranog matriksa ljuske jaja, svakako je potrebno navesti i takozvane sub-transformacijske postupke strukturnog odjeljivanja kojima se, kiselinskom obradom ljuske jaja s koje je prethodno uklonjen prijanjajući sloj bjelanjka, dobivaju membrane jaja i otopine odgovarajućih kalcijevih soli (Torres-Mansilla i Delgado-Mejía, 2017.; Tomičić, 2020.; Zajec, 2020.). Naime, izlaganje kalcijeva karbonata kalcificiranog matriksa ljuske jaja djelovanju različitih kiselina rezultira njegovim otapanjem, odnosno kemijskom reakcijom u kojoj iz kalcijeva karbonata nastaje odgovarajuća kalcijeva sol uz istovremeno oslobađanje ugljikova dioksida. Štoviše, izlaganje ljuske jaja kiselinama, prema Vladu (2009.), dovodi do smanjena mikrobiološke kontaminacije, uključujući i smanjenje kontaminacije patogenim mikroorganizmima te bi se, u skladu s postojećom zakonskom regulativom, kiselinska obrada mogla razmatrati kao alternativni postupak obrade ljuske jaja. Nažalost, u dijelu literaturno dostupnih podataka proces proizvodnje kalcijevih soli iz kalcificiranog matriksa ljuske jaja, nakon provedenog postupka kiselinske transformacije ljuske jaja, uključuje i odbacivanje membrana jaja kao proizvodnog „otpada”. Ovo odbacivanje

membrana jaja nakon kiselinske obrade ljuske jaja čini se nadasve neopravdanim, posebice uzmu li se u obzir podaci istraživanja Torres-Mansilla i Delgado-Mejíe, (2017.) i Zajeca (2020.), koji ukazuju da kiselinska obrada samo djelomično utječe na kemijski sastav membrana jaja.

Na temelju prethodno navedenog, očigledno je da se ljuska jaja u pogonima za obradu može iskoristiti za dobivanje tri različita proizvoda, pri čemu bi se takvom obradom, osim sprječavanja negativnog utjecaja na okoliš zbog njena odlaganja na odlagališta (Glatz i sur., 2011.), ujedno mogao ostvariti i određeni profit namjesto troška za njeno zbrinjavanje. Nadalje, pomnim planiranjem njene obrade u pogonima za preradu približilo bi se „zero waste” modelu, gdje bi se količine „otpada” nastalog u ovakvim pogonima svele na najmanju moguću mjeru, s minimalnim utjecajem na okoliš.

Da je transformacija ljuske jaja po strukturi realnost, pokazuju rezultati završenih Europskih projekata: Shellbrane (EC, 2014.) i EcoShell (EC, 2021.), ali isto tako i podaci o proizvodima iz ljuske jaja proizvedenih i dostupnih na tržištu Europske unije. Tako tvrtka Eggново iz Španjolske na tržištu EU-a nudi 4 proizvoda dobivenih transformacijom ljuske jaja po strukturi, pri čemu su proizvodi nazvani Ovomet, Ovoderm i Ovopet dobiveni iz membrana jaja, a Ovocet iz kalcificiranog matriksa ljuske jaja (Eggново, 2021). Nadalje, nizozemska tvrtka Dutch Eggmembrane Protein Powder B.V. na tržištu EU-a nudi prah membrane jaja, registriran pod nazivom Eggbrane® (Eggbrane, 2021.). Povrh svega, na tržište Europske unije Uredbom EU 2018/1647 (EU, 2018.) odobreno je i plasiranje hidrolizata membrane jaja kao „nove hrane” američke tvrtke Biova, LLC, koja na američkom tržištu nudi čak 4 različita proizvoda (Biova, 2021.).

Transformacijski potencijal prijanjajućeg sloja bjelanjka

Bjelanjak jaja, koji se dobije nakon centrifugalne separacije prijanjajućeg sloja bjelanjka ljuske jaja i/ili otopina proteina bjelanjka nakon ispiranja ljuske jaja vodom, može se nakon postupaka primarne obrade navedenih u prethodnom odjeljku kao sirovina iskoristiti za proizvodnju hrane za kućne ljubimce ili, uz dodatne postupke obrade, a sve u svrhu zadovoljavanja zahtjeva zdravstvene ispravnosti, kao sirovina u prehrambenoj industriji ili za proizvodnju dodataka prehrani. Pritom se, u slučaju proizvedenih otopina proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka, najvjerojatnije mora posegnuti i za nekim od postupaka koncentriranja, od kojih se najizglednijim čini ultrafiltracija. Svakako je najzahtjevniji postupak transformacije proizvodnja pročišćenih proteina bjelanjka za koju se trebaju koristiti različite metode pročišćavanja proteina, što naravno ovisiti o proteinu od interesa, željenom stupnju čistoće i željenoj biološkoj aktivnosti (Tankrathok i sur., 2009.; Abeyrathne i sur., 2013.; Abeyrathne i sur., 2014.). Upravo zbog složenosti postupaka ovakve transformacije, kao i visokih investicijskih troškova vezanih uz proizvodnu opremu, prerada bjelanjka ili otopina proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka u čiste proteine

prvenstveno je rezervirana za pogone farmaceutske i biotehnoške industrije. Proizvedeni čisti proteini, poput ovalbumina, ovotransferina, lizozima, ovomukoida i avidina, mogu se plasirati na tržište kemikalija u znanstveno-istraživačke svrhe, dok se lizozim dodatno može plasirati kao proizvod za potrebe prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije.

Naime, lizozim je antimikrobni enzim koji katalizira hidrolizu β -1,4-glikozidnih veza između *N*-acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozamina u peptidoglikanima staničnih stjenki gram-pozitivnih bakterija te je, zbog svog značajnog antimikrobnog učinka protiv gram-pozitivnih bakterija kao i umjerenog učinka na neke gram-negativne bakterije, naišao na značajnu ulogu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Silvetti i sur., 2017.; Johnson i Larson, 2005.). Za prehrambene proizvode, poput sireva i vina, dodaje se obliku lizozim hidroklorida (aditiv oznake E1105) gdje služi za prekidanje neželjenih procesa tijekom njihove proizvodnje, dok njegova uporaba u proizvodima poput piva, hrenovki, kuhanog mesa, maslaca, majoneza, proizvoda od peradi, procesirane ribe i morskih plodova, kao aditiva za produženje trajnosti proizvoda, zasad nije odobrena od nadležnih institucija (Silvetti i sur., 2017.). S druge strane, u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji pročišćeni se lizozim koristi kao odobreni antimikrobni agens za produženje trajnosti proizvoda, bilo u obliku lizozim hidroklorida, bilo kao čista forma pročišćenog lizozima (Abeyrathne i sur., 2013.).

Transformacijski potencijal membrana jaja

Iako membrane jaja čine oko 3,3 % mase ljuske jaja na bazi suhe tvari (Zajec, 2020.), zbog nadasve pogodnog sastava (kolagen, hijaluronska kiselina, kondroitin sulfat) one predstavljaju najvrjedniju komponentu ljuske jaja kao „otpada”, s obzirom na ustanovljen pozitivan učinak membrana jaja po zdravlje, kako ljudi, tako i životinja (De Vore i Long, 2013.). U prilog tomu govore i klinička istraživanja koja pokazuju da konzumacijom membrana jaja dolazi do sniženja bolova u zglobovima uzrokovanih osteoartritisom te da sveukupno djeluju na zdravlje konzumenta, omogućavajući mu normalnu i zdravu funkciju vezivnih tkiva (Kiers i Bult, 2020.). Stoga ne čudi činjenica da se membrane jaja u novije vrijeme prvenstveno koriste za proizvodnju dodataka prehrani. Pritom se membrane odvojene od ljuske jaja, nekim od prije navedenih postupaka transformacije, po strukturi podvrgavaju blagim postupcima dezinfekcije i sušenja pri temperaturama nižim od 40 °C, kako bi njihove sastavnice ostale u svojoj nativnoj formi te se nakon mljevenja u prah koristile kao bioaktivna komponenta u proizvodnji dodataka prehrani, i to najčešće kapsuliranjem proizvedenog praha. S druge strane, ovako proizvedene membrane jaja mogu poslužiti kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih pekarskih proizvoda (Southey, 2020.) ili se primjenom dodatnih postupaka transformacije prevesti u nešto poželjniji vodotopljivi oblik dodatka prehrani (Biova, 2021., De Vore i Long, 2013.; Strohbhen i sur., 2012.; Strohbhen i sur., 2009.). Osim toga, potrebno je istaknuti da se membrane jaja već duže vrijeme značajno primjenjuju za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije, gdje se

iz membrana daljnjim postupcima prerade iz njih izoliraju pojedine bioaktivne komponente, poput hijaluronske kiseline, kondroitina i drugih glikozaminoglikana, kao i kolagena (Long i sur., 2015.; den Hoed, 2014.; Pohnkam i sur., 2011.).

Uz sve do sada navedeno, membrane jaja pokazuju velik potencijal za proizvodnju biosenzora i nosača za imobilizaciju enzima (Choi i sur., 2001; Xiao i Choi, 2002; Choi i Yiu, 2004; Wu i sur., 2004; Choi i sur., 2005; Zhang i sur., 2006; Tembe i sur., 2008; Pundir i sur., 2009; Joshi i sur., 2010; D'Souza i sur., 2013; Aini i sur., 2015; Singh i sur., 2016.; Kessi i Arias, 2018.). Pri tome se za ove potrebe pri proizvodnji membrana najčešće koristi postupak kiselinske obrade ljuske jaja, nakon kojeg se dobivaju membrane jaja potpuno oslobođene od mineralnih tvari, a koje bi mogle ometati daljnje postupke prerade membrana u biosenzore, kao i postupke imobilizacije enzima na membrane jaja kao nosača.

Transformacijski potencijal kalcificiranog matriksa ljuske jaja

Kalcificirani matriks ljuske jaja glavna je komponenta ljuske jaja kao „otpada” bogata na kalcijevom karbonatu koji čini između 92 i 97 % suhe tvari kalcificiranog matriksa. Shodno tome, kalcificirani matriks ljuske jaja predstavlja značajan izvor prirodnog kalcija te bi njegova daljnja prerada/transformacija barem dijelom trebala biti usmjerena prema proizvodnji palete proizvoda na bazi kalcija za ljudsku ili životinjsku konzumaciju. Na temelju činjenice da je kalcificirani matriks ljuske jaja dominantno mineralnog sastava, može se bez bojazni o narušavanju nutritivnog sastava podvrgnuti različitim termičkim tretmanima u svrhu reduciranja populacije nepoželjnih mikroorganizama, kao i cjelokupne mikrobne populacije. Na taj način dobila bi se zdravstveno ispravna sirovina pogodna za daljnju transformaciju u proizvode na bazi kalcija, uključujući dodatke prehrani, aditive, farmaceutske formulacije i krajnje specifične lijekove te medicinske proizvode (Waheed i sur., 2019.). S druge strane, kalcificirani se matriks ljuske jaja nakon sušenja pri nižim temperaturama može iskoristiti kao sirovina za proizvodnju tekućih i praškastih gnojiva na bazi kalcija, u proizvodnji cementa (Shiferaw i sur., 2019.; Tan i sur., 2018.), kao i proizvodnji biorazgradive plastike (Owuamanam i Cree, 2020.). Važno je istaknuti da se u većini slučajeva za proizvodnju proizvoda na bazi kalcija koristi kiselinska obrada pri čemu nastaju odgovarajuće kalcijeve soli. Na sve to upućuju i brojna znanstvena istraživanja usmjerena na mogućnost iskorištenja kalcijeva karbonata ljuske jaja u svrhu proizvodnje različitih proizvoda na bazi kalcijevih soli (Tablica 2).

Tablica 2 Neke mogućnosti iskorištenja kalcificiranog matriksa ljuske jaja za proizvodnju proizvoda na bazi kalcijevih soli

Kalcijeva sol	Izvor
Kalcijev acetat	Lizhong (1999), Xiaoyan i sur. (2006), Tomičić (2020)
Kalcijev citrat	Zeng i Ma (2010), Wang i sur. (2012), Siemiradzka i sur. (2018), Siemiradzka i sur. (2019)
Kalcijev dihidrogenfosfat	Scheideler i Ash (2003)
Kalcijev fosfat	Kang i Lee (2017)
Kalcijev fumarat	Siemiradzka i sur. (2019)
Kalcijev glukonat	Siemiradzka i sur. (2019)
Kalcijev hidrogenfosfat	Scheideler i Ash (2003)
Kalcijev hidroksiapatit	Dadihch i sur. (2013), Mignardi i sur. (2020), Tomičić (2020)
Kalcijev klorid	Garnjanagoonchorn i Changpuak (2007), Jianquan (2009), Chakraborty (2016), Domrongpokkaphan i Khemkhao (2017), Thakur i sur. (2019), Tomičić (2020)
Kalcijev malat	Lin i sur. (2012)

ZAKLJUČAK

Jedan od pet glavnih izazova održivog gospodarenja otpadom poljoprivredno-prehrambene industrije, primjenom strategije kružnog gospodarstva po „zero-waste” modelu, razvoj je inovativnih tehnika transformacije otpada u svrhu proizvodnje kemikalija, finih kemikalija, aditiva, dodataka prehrani, farmaceutskih, nutritivnih i veterinarsko-medicinskih proizvoda, enzima ili različitih funkcionalnih materijala. Iskorištavanje ljuske jaja za proizvodnju proizvoda dodane vrijednosti, s obzirom na njezin bogat sastav različitih visokovrijednih spojeva, ima velik potencijal. Već je svoju primjenu našla u proizvodnji hrane za životinje iz uzgoja i kućne ljubimce, organskih gnojiva i poboljšivača tla, komposta i bioplina, sirovina za kozmetičke proizvode, aktivne medicinske proizvode za usađivanje, *in vitro* dijagnostička medicinska pomagala, te veterinarsko-medicinske proizvode, kao i u proizvodnji proizvoda/sirovina za potrebe farmaceutske industrije. Uz

inovativne tehnike transformacije i napredna tehnička i tehnološka rješenja, moguće je spriječiti pojavu rizika za ljude i životinje te ljusku jaja iskoristiti i za proizvodnju proizvoda za prehranu ljudi. Ovo poglavlje također ukazuje i na velik potencijal cjelokupnog iskorištenja ljuske jaja, uz istovremeno približavanje konceptu bez otpada, pri čemu se pomnim planiranjem može postići jedva primjetan ekološki otisak.

ZAHVALA

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

LITERATURA

Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU (2013) Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents - A review. *Poultry Science*, **92**:3292–3299.

Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU (2014) Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white. *Poultry Science*, **93**:1001–1009.

Agencija za poljoprivredu i hranu, FAO (20. 1. 2021.) Livestock Primary. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL> (20. 1. 2021.)

Agencija za zaštitu okoliša (2010) Upute i pojmovnik za određivanje otpada prema katalogu otpada.

http://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/021_otpad/Upute/OTP_D_Upute_Katalog_otpada.pdf (21. 1. 2021.)

Agencija za zaštitu okoliša (2014) *Sprječavanje nastanka otpada od hrane prilikom obavljanja turističko-ugostiteljske djelatnosti*, Tiskara HIP, Zagreb, Hrvatska.

Aini BN, Siddiquee S, Ampon K, Rodrigues KF, Suryani S (2015) Development of glucose biosensor based on ZnO nanoparticles film and glucose oxidase-immobilized eggshell membrane. *Sensing and Bio-Sensing Research*, **4**:46-56.

Alleoni ACC (2006) Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, **63**:291-298.

Arabhosseini A, Faridi H (2018) Application of eggshell wastes as valuable and utilizable products: A review. *Research in Agricultural Engineering*, **64**:104-114.

Baláž M (2014) Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia*, **10**:3827-3843.

Biova (20. 1. 2021.) Water-Soluble Eggshell Membrane. <https://www.biova.com/#> (20. 1. 2021.)

Chakraborty AP (2016) Chicken Eggshell as Calcium Supplement Tablet. *International Journal of Science, Engineering and Management*, **1(5)**:45-49.

Choi MMF, Liang MMK, Lee AWM (2005) A biosensing method with enzyme-immobilized eggshell membranes for determination of total glucosinolates in vegetables. *Enzyme and Microbial Technology*, **36**:91–99.

Choi MMF, Pang WSH, Xiao D, Wu X (2001) An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilisation platform. *Analyst*, **126**:1558–1563.

Choi MMF, Yiu TP (2004) Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**:41–47.

Dadhich P (2013) Single step sintered calcium phosphate fibers from avian egg shell. *International Journal of Modern Physics: Conference Series*, **22**:305-312.

Den Hoed V (2014) Method of producing collagen from hydrolyzed egg membrane. Patent: US20140363418A1

De Vore DP, Long DF (2013) Anti-inflammatory activity of eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations. Patent: US8580315B2

Domrongpakkaphan V, Khemkhao M (2017) Calcium chloride produced from eggshell for vegetables washing. *The Journal of Applied Science*, **16(2)**:1-7.

Državna uprava za zaštitu okoliša (1996) Pravilnik o vrstama otpada. *Narodne novine*, **27**.

D'Souza SF, Kumar J, Jha SK, Kubal BS (2013) Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Materials Science and Engineering C*, **33**:850–854.

Eggbrane (20. 1. 2021.) Eggbrane Principal Characteristics.

<https://www.eggbrane.com/principal-characteristics> (20. 1. 2021.)

Eggnovo (20. 1. 2021.) Products. <https://www.eggnovo.com/products/> (20. 1. 2021.)

Europska komisija, EC (20. 1. 2021.) High added-value raw materials from eggshell: large-scale optimization of an innovative processing technology and EU market deployment of the eggshell-derived products (Eco-SHELL). <https://ec.europa.eu/environment/eco-innovation/projects/en/projects/eco-shell#results> (20. 1. 2021.)

Europska komisija, EC (2011) 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.

Europska komisija, EC (24. 4. 2014.) A little extra value from eggshells. <https://cordis.europa.eu/article/id/93064-a-little-extra-value-from-eggshells> (20. 1. 2021.)

Europska komisija, EC (2018) Provedbena uredba Komisije (EU) 2018/1647 od 31. listopada 2018. o odobravanju stavljanja na tržište hidrolizata jajne ovojnice kao nove hrane u skladu s Uredbom (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i Vijeća i o izmjeni Provedbene uredbe Komisije (EU) 2017/2470. *Službeni list Europske unije*, **L274**:51-55.

Europska zajednica, EC (2004) Uredba komisije (EU) br. 853/2004 Europskog parlamenta i Vijeća od 29. travnja 2004. o utvrđivanju određenih higijenskih pravila za hranu životinjskog podrijetla (konsolidirana verzija) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20160401> (21. 1. 2021.)

Europska zajednica, EZ (2009) Uredba (EZ) br. 1069/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009. o utvrđivanju zdravstvenih pravila za nusproizvode životinjskog podrijetla i od njih dobivene proizvode koji nisu namijenjeni prehrani ljudi te o stavljanju izvan snage Uredbe (EZ) br. 1774/2002 (Uredba o nusproizvodima životinjskog podrijetla). *Službeni list Europske unije*, **L300**:425-457.

Floh RV, Jalfen SL (2009) Apparatus for separating the organic membrane portion and the mineral portion of broken egg shells. Patent: US20090206009A1

Garnjanagoonchorn W, Changpuak A (2007) Preparation and Partial Characterization of Eggshell Calcium Chloride. *International Journal of Food Properties*, **10(3)**:497-503.

Glatz P, Miao Z, Rodda B (2011) Handling and Treatment of Poultry Hatchery Waste: A Review. *Sustainability*, **3**:216-237.

Hincke MT, Gautron J, Nys Yves, Rodriguez-Navaro AB (2012) The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, **17**:1266-1280.

Hrvatski sabor (2019) Zakon o održivom gospodarenju otpadom (*pročišćeni tekst zakona*). *Narodne novine*, **94/13, 73/17, 14/19, 98/19**.

Jianquan (2009) Biological calcium carbonate extracting solution and production method thereof. Patent: CN101554387A

Johnson EA, Larson AE (2005) Lysozyme. *U: Antimicrobials in food* (Davidson PM, Sofos JN, Branen AL, Ur.) Third Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD. Str. 361-387.

Joshi P, Joshi HC, Sanghi SK, Kundu S (2010) Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. *Microchim Acta*, **169**:383–388.

Kang TS, Lee SJ (2017) Fabrication of Calcium Phosphate Glass Using Eggshell and its Crystallization Behavior. *Journal of the Korean Ceramic Society*, **54(5)**:395-399.

Kessi E, Arias JL (2018) Using Natural Waste Material as a Matrix for the Immobilization of

Enzymes: Chicken Eggshell Membrane Powder for β -Galactosidase Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **187(1)**:101-115.

Kiers JL, Bult JHF (2020) Mildly Processed Natural Eggshell Membrane Alleviates Joint Pain Associated with Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Medical Food* - ahead of print <http://doi.org/10.1089/jmf.2020.0034>.

King'ori AM (2011) A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. *International Journal of Poultry Science*, **10**:908-912.

Lin S, Wang L, Jones G, Trang H, Yin Y, Liu J (2012). Optimised extraction of calcium malate from eggshell treated by PEF and an absorption assessment *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **50(5)**:1327–1333.

Lizhong W (1999) Preparation of food-level calcium acetate by using egg shell and other biological waste as raw material. Patent: CN1274712

Long FD, Adams RG, De Vore DP (2005) Preparation of hyaluronic acid from eggshell membrane. Patent: US6946551B2

MacNeil JH (2001) Method and apparatus for separating a protein membrane and shell material in waste egg shells. Patent: US6176376B1

MacNeil JH (2005) Hatchery eggshell waste processing method and device. Patent: US6899294B2

Mignardi S, Archilletti L, Medeghini L, DeVito C (2020) Valorization of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Scientific Reports*, **10(1)**:e2436.

Miguel M, Ramos M, Manso MA (2005) Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods. *European Food Research and Technology*, **221**:542-546.

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2009) Pravilnik o nusproizvodima životinjskog porijekla koji nisu za prehranu ljudi. *Narodne novine*, **87**.

Ministarstvo zaštite okoliša i prirode (2013) Katalog otpada. https://mzoe.gov.hr/UserDocsImages/NASLOVNE%20FOTOGRAFIJE%20I%20KORI%C5%A0TENI%20LOGOTIPOVI/doc/katalog_otpada_-_smjernice_za_koristenje_priloga_iii-v_uredbe_ez_10132006_o_otpremi_posiljaka_otpada.pdf (21. 1. 2021.)

Ministarstvo zaštite okoliša i prirode (2015) Pravilnik o katalogu otpada. *Narodne novine*, **90**.

Mittal A, Teotia M, Soni RK, Mittal J (2016) Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents. *Journal of Molecular Liquids*, **223**:376-387.

Nakano T, Ikawa NI, Ozimek L (2003) Chemical Composition of Chicken Eggshell and Shell Membranes. *Poultry Science*, **82**:510-514.

Owuamanam S, Cree D (2020) Progress of Bio-Calcium Carbonate Waste Eggshell and Seashell Fillers in Polymer Composites: A Review. *Journal of Composites Science*, **4(2)**:70; doi:10.3390/jcs4020070.

Ponkham W, Limroongreungrat K, Sangnar A (2011) Extraction of collagen from hen eggshell membrane by using organic acids. *Thai Journal of Agricultural Science*, **44(5)**:354-360.

Pundir CS, Bhambi M, Chauhan NS (2009) Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inter support in urinary oxalate determination. *Talanta*, **77**:1688-1693.

Ray S, Barman AK, Roy PK, Singh BK (2017) Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation Journal*, **6(9)**:1-4.

Réhault-Godbert S, Guyot N, Nys Y (2019) The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, **11**:1-26.

Scheideler SE, Ash JA (2003) Eggshell derived monocalcium and dicalcium phosphate. Patent: US6649201

Shiferaw N, Habte L, Thenepalli T, Ahn JW (2019) Effect of Eggshell Powder on the Hydration of Cement Paste. *Materials*, **12(15)**:2483; doi:10.3390/ma12152483.

Siemiradzka W, Dolińska B, Ryszka F (2018) New Sources of Calcium (Chicken Eggshells, Chelates) - Preparation of Raw Material and Tablets. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **19**:566-572.

Siemiradzka W, Dolińska B, Ryszka F (2019) An ecological and multi valuable raw material for obtaining effective calcium preparations. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **5(1)**: 50-57.

Sigma-Aldrich a) (20. 1. 2021) Product Comparison Guide: Albumin from chicken egg white.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/albuminfromchickeneggwhite12345900659111?lang=en®ion=HR&attrlist=Purification%20method|Type> (20. 1. 2021.)

Sigma-Aldrich b) (20. 1. 2021) Conalbumin from chicken egg white. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=conalbumin+from+egg+white&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=HR&focus=product> (20. 1. 2021.)

Sigma-Aldrich c) (20. 1. 2021) Lysozyme from chicken egg white. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=lysozyme+from+egg+white&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=HR&focus=product> (20. 1. 2021.)

Silvetti T, Morandi S, Hintersteiner M, Brasca M (2017) Use of Hen Egg White Lysozyme in the Food Industry. *U: Egg Innovations and Strategies for Improvements* (Hester P, Ur.), Academic Press, New York, SAD. Str. 233-242.

Singh AK, Roychoudhury A, Jha SK (2016) Reusable Glucose Sensor Based on Enzyme Immobilized Egg-shell Membrane. *Analytical Sciences*, **32**:1077-1082.

Southey F (9. 10. 2020) Chicken eggshell membrane upcycled for bakery: „Eggbrane alleviates joint stiffness and pain“.

<https://www.foodnavigator.com/Article/2020/10/09/Chicken-eggshell-membrane-upcycled-for-bakery-Eggbrane-alleviates-joint-stiffness-and-pain> (20. 1. 2021.)

Strohbehne RE, Etzel LR, Figgins J (2009) Novel process for solubilizing protein from a proteinaceous material and composition thereof. Patent: US20090104173A1

Strohbehne RE, Etzel LR, Figgins J (2012) Process for solubilizing protein from a proteinaceous material and composition thereof. Patent: US8197853B2

Tan YY, Doh SI and Chin SC (2018) Eggshell as a partial cement replacement in concrete development. *Magazine of Concrete Research*, **70(13)**: 662–670.

Tankrathok A, Daduang A, Patramanon R, Araki T, Thammasirirak S (2009) Purification Process for the Preparation and Characterizations of Hen Egg White Ovalbumin, Lysozyme, Ovotransferrin, and Ovomucoid. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **39**:380–399.

Tembe S, Kubal BS, Karve M, D'Souza SF (2008) Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus campanulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. *Analytica Chimica Acta*, **612**:212-217.

Thakur RJ, Shaikh H, Gat Y, Waghmare RB (2019) 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.

Thoroski JH (2003) Eggshell processing methods and apparatus. Patent: US166213B1

Tomičić K (2020) Proizvodnja kalcijevih soli iz ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

Torres-Mansilla A, Delgado-Mejía E (2017) Influence of Separation Techniques with Acid Solutions on the Composition of Eggshell Membrane. *International Journal of Poultry Science*, **16**:451-456.

Tsai WT, Yang YM, Lai CW, Cheng YH, Lin CC, Yeh CW (2006) Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*, **97**:488-493.

- Vlad V (2009) Eggshell membrane separation method. Patent: US7584909B2
- Waheed M, Butt MS, Shehzad A, Adzahan NM, Shabbir MA, HAR Suleria, Aadil RM (2019) Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science & Technology*, **91**:219-230.
- Walton HV, Cotterill OJ, Vandepopuliere JM (1973) Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants. *Poultry Science*, **52**:1836-1841.
- Wang WB, Zhao YQ, Sun H (2012) Study on preparation of calcium citrate from egg shell. *Applied Chemical Industry*, **41(1)**:557–558.
- Wu B, Zhang G, Shuang S, Choi MMF (2004) Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta*, **64**:546–553.
- Xiao D, Choi MMF (2002) Aspartame Optical Biosensor with Bienzyme-Immobilized Eggshell Membrane and Oxygen-Sensitive Optode Membrane. *Analytical Chemistry*, **74**:863-870.
- Xiaoyan Z, Xin G, Deyu Y (2006) Method for producing calcium acetate with egg shell. Patent: CN101172942
- Yoo S, Hsieh JS, Zou P, Kokoszka J (2009) Utilization of calcium carbonate particles from eggshell waste as coating pigments for ink-jet printing paper. *Bioresource Technology*, **100**:6416-6421.
- Zajec M (2020) Izolacija proteina i membrana ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
- Zeng X, Ma MH (2010) Technologic research on transforming calcium carbonate in egg shell to calcium citrate. *Scientia Agricultura Sinica*, **43(5)**:1031–1040.
- Zhang G, Liu D, Shuang S, Choi MMF (2006) A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B*, **114**:936–942.