

第六届"安捷伦杯"宁波市大学生化学学科创新技能大赛

实验项目研究报告

项目名称: 乳酸钙制备及含量测定

参赛队伍: 浙大宁波理工学院 2 队

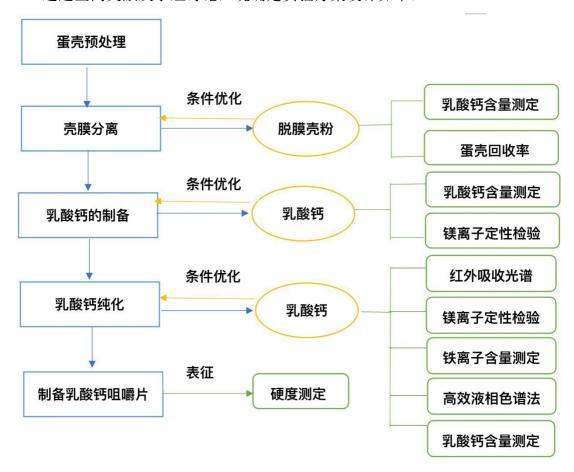
参赛学生:邓培根、姚羽、章涵、陈颖君、曹艺薇

指导教师: <u>周先波 管成</u>

2021年5月

实验方案设计

通过查阅文献及小组讨论,现确定实验方案设计如下:



1、壳膜分离条件的优化

表 1 壳膜分离实验优化条件的设置

实验优化项目	实验条件设置							
膜分离方法	超声+酶	只超声	不超声不加西	每				
酶用量	4‰	6‰	8‰	10‰	12‰			
pН	4	5	5.5	6	6.5	7	7.5	
超声时间/min	40	60	80	100	120			
固液比/g	1: 5	1: 6	1: 7	1: 8	1: 9			
反应温度/℃	25	35	45	55	65			

2、乳酸钙的制备及纯化条件优化

表 2 乳酸钙的制备及纯化实验优化条件的设置

实验优化项目				实验条件	牛设置	
物料比	0.8:2	0.9:2	1.0:2	1.1:2	1.2:2	1.3:2
反应时间/min	40	60	80	100	120	
料液比/mL	54	72	90	108	126	
反应温度/℃	25	35	45	55	65	
рН	10	11	12	13		

乳酸钙制备及含量测定

摘要

鸡蛋壳中含有丰富的钙资源,如果采用合适的技术对其加以利用,既可以使 其变废为宝,又可以防止蛋壳对生态环境的污染。本文从绿色化学的角度出发对 鸡蛋壳中碳酸钙转化为乳酸钙的工艺流程进行优化研究,发现采用木瓜蛋白酶+ 超声辅助法相结合时壳膜分离效果较好,当酶质量分数为蛋壳粉的 1%、溶液 pH 为 6、固液质量比 1:8、反应温度 65℃、超声时间仅需 40min 时,蛋壳回收率为 93.16%,钙含量为 98.31%。

将优化条件下得到的脱膜蛋壳粉与乳酸在超声辅助下制备乳酸钙。通过单因素法探讨酸料比、固液比、反应温度和反应时间对乳酸钙收率和钙含量的影响。采用红外光谱、高效液相色谱和配合滴定对乳酸钙进行结构表征和含量测定。结果表明,脱膜壳粉与乳酸物质的量之比为 0.9:2、乳酸与蒸馏水的质量比为 1:12、反应温度 35℃、反应时间为 80min 时乳酸钙收率为 83.31%,钙含量为 93.59%。通过除杂纯化后乳酸钙收率为 96.72%,钙含量为 96.01%,乳酸含量为 116.3%,该产品为含有两个结晶水的乳酸钙。

将乳酸钙、玉米淀粉和硬脂酸镁以质量比 30:69:1 比例混合、研磨并制成乳酸钙咀嚼片,每片钙含量为 41.50%,硬度为 70.68N。

本实验以鸡蛋壳为原料,采用木瓜蛋白酶+超声辅助法相结合制备乳酸钙的 生产工艺,时间短、条件简易、能耗低、对环境无污染,收率和纯度高,大幅提 高生产效率,具有广阔的应用前景。

关键词:鸡蛋壳、木瓜蛋白酶、超声辅助、乳酸钙咀嚼片

目录

1. 前言		7
2. 材料与	5方法	7
2.1 材料	斗与仪器	7
2.1.1	材料	7
2.1.2	仪器	8
2.2 实际	险方法	9
2.2.1	蛋壳的预处理	9
2.2.2	壳膜分离	9
2.2.3	乳酸钙的制备	9
2.2.4	乳酸钙的纯化	. 10
2.2.5	乳酸钙咀嚼片的制备	. 10
2.3 乳酮	竣钙的表征	.10
2.3.1	红外光谱分析	. 10
2.3.2	镁离子的检验	. 10
2.3.3	铁离子含量的测定	. 10
2.3.4	配合滴定法测定乳酸钙含量	. 11
2.3.5	高效液相色谱分析	. 11
2.4 乳酮	该 钙咀嚼片硬度的测定	.11
3. 结果与	5讨论	.11
3.1 鸡鱼	蛋壳膜分离条件优化	.11
3.1.1	壳膜分离方法对壳膜分离的影响	. 11
3.1.2	酶用量对壳膜分离的影响	. 12
3.1.3	pH 对壳膜分离的影响	. 13
3.1.4	固液质量比对壳膜分离的影响	. 14
3.1.5	超声时间对壳膜分离的影响	. 14
3.1.6	反应温度对壳膜分离的影响	. 15
3.1.7	重复性实验	. 16
3.2 乳酮	痠钙制备条件的优化	.16

3.2.1 反应物物料比对乳酸钙收率的影响	16
3.2.2 反应时间对乳酸钙收率的影响	17
3.2.3 料液体积比对乳酸钙收率的影响	18
3.2.4 反应温度对乳酸钙收率的影响	18
3.2.5 重复性实验	19
3.3 乳酸钙的纯化	20
3.3.1 镁、铁、铅等金属离子的消除	20
3.3.2 加入不良溶剂乙醇对乳酸钙析出时间的影响	20
3.4 乳酸钙产品的表征结果	21
3.4.1 红外结果分析	21
3.4.2 镁离子定性检验	21
3.4.3 铁离子含量测定	22
3.4.4 乳酸钙含量测定	23
3.4.5 液相色谱测定乳酸钙粉末中乳酸含量	24
3.4.6 乳酸钙咀嚼片乳酸含量的测定	24
3.6.7 乳酸钙咀嚼片硬度的测定	25
4. 结论	25
参考文献	27

1. 前言

我国是世界禽蛋大国,每年都有大量的废弃蛋壳,21世纪,我国食品业发展迅速,大量鸡蛋被消耗的同时,也留下了大量的鸡蛋壳。蛋壳主要由95%以上的碳酸钙和3.5%的有机基质复合而成[1],可作为制备有机钙的重要钙源,以缓解碳酸钙矿石的开采力度,促进社会可持续发展。乳酸钙作为钙源相对于其他钙源来说有很多优势,它易溶于水,易吸收,无异味,无副作用,除了被广泛应用于食品领域还广泛用于医药,农学等[2]。利用蛋壳制取乳酸钙不仅开发了家禽行业的深加工产业链,同时还解决了大量蛋壳污染空气的问题,成功将蛋壳"变废为宝"。

目前鸡蛋壳制备乳酸钙的主要方法有高温煅烧法、发酵法和酶法等。其中高温煅烧虽然有较高的产率,但其耗时长,能耗大,成本高,在煅烧过程中会产生大量的 CO 和粉尘污染,对环境不友好,同时高温也会破坏蛋壳的天然活性[3~4];发酵法是一种快捷利用蛋壳制备乳酸钙的方法,但它对产品的分离提纯要求较高[5~6];而酶法中以碱性蛋白酶为首,均具有极高的选择性,无法充分分解壳膜[7~8]。

本实验通过查阅大量国内外有关鸡蛋壳转化制取乳酸钙的文献资料,比对制备方法的优缺点和分析现有工艺技术的基础上,选用了酶+超声辅助法来进行壳膜分离,酶通过分解壳内膜和真壳蛋白质纤维降低膜壳结合力,使膜最大程度脱离,超声辅助减少脱膜时间同时两者相结合能使壳膜分离的程度更大[9~11]。

采用"酶+超声辅助"法不仅解决了高温煅烧法带来的环境污染,耗能大的问题,还具有条件温和、保护蛋壳天然活性,脱膜程度大的优势。而且大大缩短了制备时间且提高了蛋壳的转化率。选用的木瓜蛋白酶选择性低,相比碱性蛋白酶能使壳膜分离更彻底,从而提高产品收率[12],具有广阔的应用前景。

2. 材料与方法

- 2.1 材料与仪器
- 2.1.1 材料

表 1 原料及其他化学试剂一览表

名称	规格	生产厂家
鸡蛋蛋壳		来自宁波理工学院食堂
无水醋酸钠	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
浓氨水	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
冰醋酸	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
氯化铵	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
木瓜蛋白酶	100000U	罗恩试剂
氢氧化钙	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
碳酸钙	99.8%	上海麦克林生化科技有限公司
钙羧酸	25g	国药集团上海化学试剂有限公司
乙二胺四乙酸二钠	AR	广东省化学试剂工程技术研究开发中心
氢氧化钠	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
过硫酸铵	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药集团上海化学试剂有限公司
乳酸	AR (85%)	国药集团上海化学试剂有限公司
食品级玉米淀粉	1000g	曲阜市天利药用辅料有限公司
硬脂酸镁	AR	国药集团上海化学试剂有限公司

2.1.2 仪器

表 2 设备仪器一览表

仪器设备名称	型号与规格	生产厂家
电子天平	YP10002	上海佑科仪器仪表有限公司
封闭电炉	DL-1	上海本亭仪器有限公司
流水式制冰机	HZB-150F/L	宁波惠康国际工业有限公司
循环水真空泵	SHZ-DIII	巩义市予华仪器有限责任公司
超声波清洗机	SB-5200DT	宁波新芝生物科技股份有限公司
电热恒温鼓风干燥机	DGG-9240A	上海森信实验仪器有限公司
电子天平	YP5002	上海佑科仪器仪表有限公司

分样筛	100 目	中国安平振兴筛具厂
紫外-可见分光光度计	UV7500	上海佑科仪器仪表有限公司
1000g 密封型摇摆式粉碎机	BZFS-20C	西安宝正实业有限公司
实验室 pH 计	FE20	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
电子天平	AL204	梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
傅里叶红外光谱仪	Vertex70	德国布鲁克公司
高效液相色谱仪	e2695	Waters Corporation
片剂四用测定仪	SY-2D	黄海药检
压片机	YP-2	上海山岳科学仪器有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 蛋壳的预处理

将食堂废弃的鸡蛋壳放入清水中浸泡 24h 后,清洗干净后,放入 80℃烘箱中烘干 8h,经粉碎机粉碎后过 100 目不锈钢筛。

2.2.2 壳膜分离

称取预处理后的蛋壳粉 4.2g,置于 250mL 烧杯,分别加入 0.042 克木瓜蛋白酶和 33.6ml pH 为 6 的缓冲溶液。将烧杯置于超声波清洗机内,边超声边搅拌,控制反应温度为 65℃,反应 40min 后,溶液静置至分层,分离出上层鸡蛋壳膜,抽滤,去离子水洗涤滤饼 3 次,烘箱 110℃干燥至恒重,得脱膜后蛋壳粉,称重,计算蛋壳回收率。

2.2.3 乳酸钙的制备

将脱膜壳粉置于 500ml 烧杯中,分别加入 9g 乳酸(含量 85%)和 92ml 水,在超声波清洗器恒温 35℃反应 80min 后,趁热抽滤得母液,将母液蒸发浓缩至 30ml,冷却至室温,加入不良溶剂无水乙醇,冰浴 15min 充分结晶,用空心塞研磨晶体,抽滤,用适量乙醇洗涤晶体至中性,将晶体转移至培养皿,放入烘箱 110℃烘干 2h,称重,并测定乳酸钙含量,按照收率= $\frac{m(样 B)}{m(理论)}*\omega(Ca^{2+})*100%$,

计算。

2.2.4 乳酸钙的纯化

将脱膜壳粉置于 500ml 烧杯中,分别加入 9g 乳酸(含量 85%)和 92ml 水,在超声波清洗器恒温 35℃反应 80min 后,加入适量氢氧化钙,调节溶液 pH 值为 11,加热纯化 5min,趁热抽滤得母液,其他步骤同 2.2.3。

2.2.5 乳酸钙咀嚼片的制备

分别称取乳酸钙 3.00 克、食品级淀粉 6.97g 和硬脂酸镁 0.03g 于干净研钵中, 充分碾磨后, 称取 1.00g 混合样品, 转入模具中, 用压片机进行压片, 得乳酸钙咀嚼片。

2.3 乳酸钙的表征

2.3.1 红外光谱分析

采用 KBr 压片法,在德国布鲁克公司的 Vertex 70 型傅立叶红外光谱仪中测试得到乳酸钙的红外光谱,波数扫描范围为 400~4000 cm⁻¹。

2.3.2 镁离子的检验

取乳酸钙除杂前后产品各 0.03g 左右,分别溶于 5ml 蒸馏水中,各加 2 滴镁指示剂定性检验溶液中的 Mg²⁺,观察溶液颜色变化^[14]。

2.3.3 铁离子含量的测定

根据 GB 1886.21-2016 "食品添加剂 乳酸钙"食品安全国家标准,取 2.5ml 铁标准溶液 (10mg/L),置于 50ml 纳式比色管中,加 4ml 盐酸溶液与 50mg 过硫酸铵,用水稀释到 35ml 后,加 3 ml 硫氰酸铵溶液,用水稀释至 50ml 纳式比色管,得到标准比色溶液^[15]。

称取 0.5g 试样,精确至 0.01g,加 25ml水,置于水浴中加热溶解,冷却后

为试样溶液,加 4ml 盐酸溶液与 50mg 过硫酸铵,用水稀释到 35ml 后,加 3 ml 硫氰酸铵溶液,用水稀释至 50ml 纳式比色管得到试样溶液。

比较试样溶液和标准比色溶液的颜色。

2.3.4 配合滴定法测定乳酸钙含量

准确称取乳酸钙样品 0.1g(精确到 0.0000g)置于 250ml 锥形瓶中,以少量去离子水湿润,缓慢滴加 10ml 1:1 盐酸溶解至试液完全透明,补加去离子水 50ml,用 6.0mol/L 的 NaOH 溶液调节溶液 pH 值在 10 至 11 之间,滴入 5 滴 0.2%的钙指示剂溶液后,用 0.02mol/L 的 EDTA 标准溶液滴定至溶液由酒红色恰好变为蓝色且 30s 不变色即为终点,平行操作 3 次,同时做空白试验,由以下公式计算可得产品的钙含量:

$$\omega(Ca^{2+}) = \frac{c_{\rm EDTA} \times (V_{\rm EDTA} - V_0) \times M_{CaL}}{m_{CaL}} \times 100\%$$

式中: ω (Ca²⁺) ——钙含量; C_{EDTA} ——EDTA 标准溶液浓度,单位为 mol/L; V_{EDTA} ——试样消耗 EDTA 标准溶液体积,单位为 L; M_{CaL} ——钙的摩尔质量 (218.2g/mol); m_{CaL} ——乳酸钙试样质量,单位为 g。

2.3.5 高效液相色谱分析

在 Water e2695 液相色谱仪配 2998 二极管阵列检测器中进行液相色谱分析。

2.4 乳酸钙咀嚼片硬度的测定

用片剂四用测定仪测定乳酸钙咀嚼片的硬度。

3. 结果与讨论

3.1 鸡蛋壳膜分离条件优化

3.1.1 壳膜分离方法对壳膜分离的影响

蛋壳粉 20g,设计三组对照实验,分别为超声加木瓜蛋白酶、不超声不加木

瓜蛋白酶、只加木瓜蛋白酶不超声,实验步骤同 2.2.2。不同分离方法对蛋壳回收率的影响实验结果如图 1 所示。

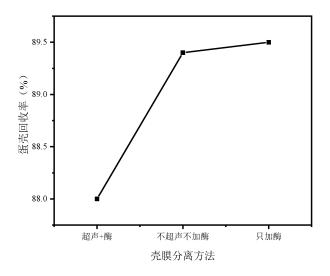


图 1 壳膜分离方法对蛋壳回收率的影响

图 1 实验结果表明,在反应体系中加入木瓜蛋白酶,并使用超声,促进鸡蛋壳与壳下膜分离,蛋壳回收率明显低于其他两种分离方法。因此,选用"超声+酶"的方法最为适宜。

3.1.2 酶用量对壳膜分离的影响

蛋壳粉用量为 20g, 加 pH=6 缓冲液的量为 160ml, 超声 60min, 反应温度为 55℃。酶用量分为 5 个水平, 分别为 4‰、6‰、8‰、10‰、12‰, 其余步骤同 2.2.2。不同酶用量对蛋壳回收率的影响实验结果如图 2 所示。

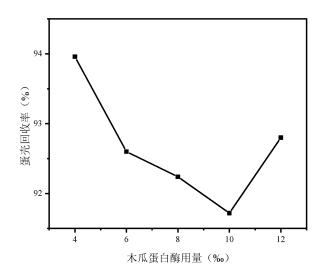


图 2 酶用量对壳膜分离效果的影响

图 2 实验结果表明,木瓜蛋白酶能够对鸡蛋壳进行有效的壳膜分离。随着酶用量的增加,脱膜后的蛋壳回收率呈现先下降后上升的趋势。在木瓜蛋白酶的酶解作用下,连接蛋壳内膜与真壳的蛋白质纤维被酶解,蛋壳内膜与真壳乳头层钙状锥形体之间的结合力降低,使得壳与膜发生分离。在酶用量为 10%时脱膜后的蛋壳回收率达到最小值,当酶用量继续增加,过量的木瓜蛋白酶与分离出的壳下膜反应,造成蛋壳回收率反而有所上升。

因此,选用木瓜蛋白酶进行壳膜分离时酶用量选择为蛋壳粉质量的 10%较为适宜。

3.1.3 pH 对壳膜分离的影响

蛋壳粉用量为 20g, 加酶 0.2g, 超声 60min, 反应温度为 55℃。pH 缓冲液分为 8 个水平,分别为 4、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8,且缓冲液用量为 160ml,其余步骤同 2.2.2,同时测定脱膜蛋壳粉中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的吸光度。不同 pH 值对蛋壳回收率的影响实验结果如图 3 和图 4 所示。

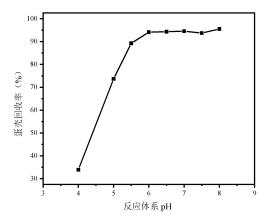


图 3 pH 对壳膜分离效果的影响

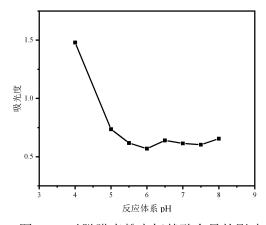


图 4 pH 对脱膜壳粉中氨基酸含量的影响

图 3 和图 4 实验结果表明,反应体系的 pH 值对壳膜分离效果有着直接的影响。缓冲溶液 pH<6 时,蛋壳粉与缓冲溶液直接反应; pH>6 时,酶活性受到抑制,不能对鸡蛋壳中的蛋白质纤维进行有效的酶解,壳膜分离效果相近。因此,实验中反应体系控制在 pH 为 6 较适宜。

3.1.4 固液质量比对壳膜分离的影响

蛋壳粉用量为 20g,加酶 0.2g,缓冲液 pH 为 6,超声 60min,反应温度为 55 $^{\circ}$ 。 固液比分为 5 个水平,分别为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9,其余步骤同 2.2.2。不同固液比对蛋壳回收率的影响实验结果如图 5 所示。

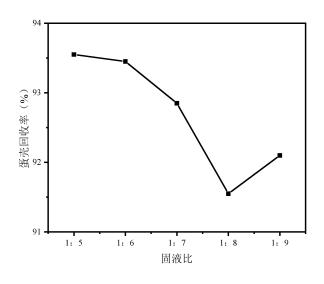


图 5 固液比对壳膜分离效果的影响

图 5 实验结果表明,蛋壳回收率随着反应体系溶液体积的增大,先下降后上升。由此说明,溶液较少时,木瓜蛋白酶的活性没有得到充分的发挥。随着溶液体积的增加,反应体系中的酶解作用越来越强,真壳与壳下膜之间的结合力逐渐降低,壳膜分离效果越完全。溶液体积增加到一定程度时,木瓜蛋白酶与壳下膜发生反应,鸡蛋壳回收率增加。当固液比达到 1:8 时,脱膜效果最好。因此,选用固液比为 1:8 比较适宜。

3.1.5 超声时间对壳膜分离的影响

蛋壳粉用量为 20g, 加酶 0.2g, 缓冲液 pH 为 6 的用量为 160ml, 超声 60min, 反应温度为 55℃。超声时间分为 5 个水平, 分别为 40min、60min、80min、100min、

120min,其余步骤同 2.2.2。不同超声时间对蛋壳回收率的影响实验结果如图 6 所示。

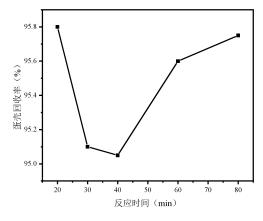


图 6 超声时间对壳膜分离效果的影响

由于仪器功能限制,超声波振荡频率不可调,该方法仅对反应时间对壳膜分离效果的影响进行了研究。图 6 实验结果表明,随着反应时间的增加,蛋壳回收率呈现先下降后上升的趋势。反应时间达到 40min 时,蛋壳回收率最小。继续延长反应时间,反应体系中残余的木瓜蛋白酶与分离出的壳下膜反应,时间继续越长,对壳下膜造成的损耗越多,消耗的能源也随时间的延长而增多。因此,试验中的反应时间选择 40min 较为适宜。

3.1.6 反应温度对壳膜分离的影响

蛋壳粉用量为 20g,加酶 0.2g,缓冲液 pH=6 的用量为 160ml,超声 40min。反应温度分为 5 个水平,分别为 25 \mathbb{C} 、35 \mathbb{C} 、45 \mathbb{C} 、55 \mathbb{C} 、65 \mathbb{C} ,其余步骤同 2.2.2。不同反应温度对蛋壳回收率的影响实验结果如图 7 所示。

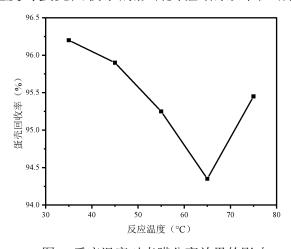


图 7 反应温度对壳膜分离效果的影响

图 7 实验结果表明,随着反应温度的上升,蛋壳回收率呈现出先下降后下上升的变化趋势。由此说明木瓜蛋白酶只有在一个最为适宜的温度范围内才能充分发挥其酶活力,温度过高或者过低都会抑制木瓜蛋白酶的酶活力,对酶解效果产生明显的影响。当反应温度控制在 65℃左右时,木瓜蛋白酶活力最高,酶解效果最好,蛋壳回收率最小。因此,实验中选择 65℃的反应温度比较适宜。

3.1.7 重复性实验

根据上述6个单因素变量实验条件的探究,将6个最佳因素整合,进行重复性实验。实验步骤同2.2.2。实验结果如图8所示。

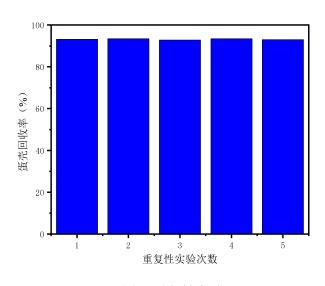


图 8 重复性实验

图 8 实验结果表明,实验重复性良好,符合实验要求。

3.2 乳酸钙制备条件的优化

3.2.1 反应物物料比对乳酸钙收率的影响

采用单因素实验法,乳酸 9g(浓度 85%),加水量为 120ml,反应时间为 60min,温度为 35 °C,去膜壳粉与乳酸物质的量之比为 0.8:2, 0.9:2, 1.0:2, 1.1:2, 1.2:2, 其余步骤同 2.2.3。反应物物料比对乳酸钙收率影响实验结果如图。

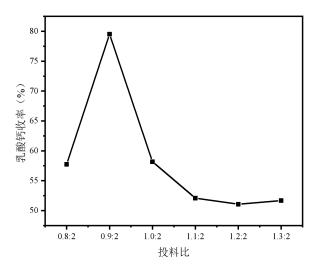


图 9 反应物物料比对乳酸钙收率的影响

图 9 实验结果表明,随着脱膜壳粉的比例增大,收率先上升后下降然后趋于平缓,脱膜壳粉少,产品呈现微黄说明乳酸过量,脱膜壳粉过多,会吸附乳酸钙,导致乳酸钙收率下降。因此,脱膜壳粉和乳酸物质的量之比为 0.9: 2 比较适宜。

3.2.2 反应时间对乳酸钙收率的影响

乳酸 9g (浓度 85%),蛋壳粉 3.83g,加水量为 120ml,反温度为 35℃,反应时间为五个水平,分别为 40min,60min,80min,100min,120min, 其余步骤同 2.2.3。反应时间对乳酸钙收率影响的实验结果如图 10。

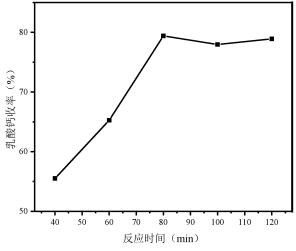


图 10 反应时间对乳酸钙收率的影响

图 10 实验结果表明,随着反应时间的增大,乳酸钙收率先上升后下降然后 趋于平缓。反应前期反应速度较快,乳酸钙的收率迅速增加,当反应超过 80min 之后,乳酸钙浓度逐渐增高,乳酸浓度下降,正反应速率下降,收率逐渐减小,且随着时间增加,超声波可能使副反应发生的几率增大。因此,反应时间选择80min 比较适宜。

3.2.3 料液体积比对乳酸钙收率的影响

乳酸 9g,乳酸(85%)蛋壳粉 3.83g,反应温度为 35 °C,反应时间为 80min,水的体积为五个水平,分别为 54ml,72ml,92ml,108ml,126ml,其余步骤同 2.2.3。料液体积比对乳酸钙收率影响的实验结果如图 11。

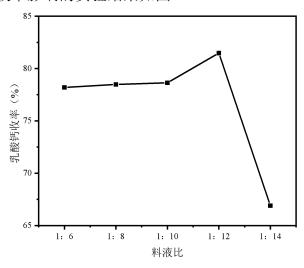


图 11 料液体积比对乳酸钙收率的影响

图 11 实验结果表明,随着加水量的增多,乳酸钙收率先缓慢上升后下降。 乳酸钙溶水,随着体系蒸馏水的增加,反应更充分,乳酸钙的收率增加,料液体 积比超过 1: 12 之后,乳酸被水稀释,反应速度缓慢。因此,料液体积比选择 1: 12 比较适宜。

3.2.4 反应温度对乳酸钙收率的影响

乳酸 9g(浓度 85%),蛋壳粉 3.83g,反应时间为 80min,水 90ml,反应温度为五个水平,分别是 25 \mathbb{C} 、35 \mathbb{C} 、45 \mathbb{C} 、55 \mathbb{C} 、65 \mathbb{C} ,其余步骤同 2.2.3。反应温度对乳酸钙收率影响的实验结果如图 12。

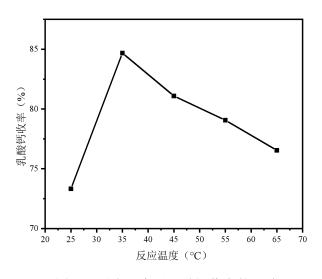


图 12 反应温度对乳酸钙收率的影响

图 12 结果表明,温度对收率的影响情况先增加再下降。温度升高加大分子间的碰撞,促使反应正向进行,但是随着温度的不断增高,乳酸可能发生酯化反应生成乳醛乳酸,造成乳酸钙收率下降。因此反应在 35℃下进行比较适宜。

3.2.5 重复性实验

采用因素探究中较适宜的条件进行重复性试验,乳酸 9g(浓度 85%),蛋壳粉 3.83g,反应时间为 80min,反应温度 35℃,水 90ml,其余步骤同 2.2.3。重复性实验的实验结果如图 13。

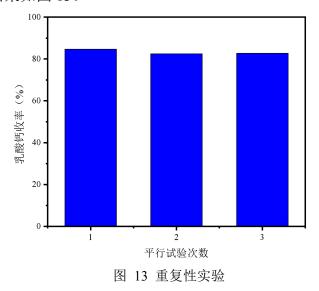


图 13 结果表明,实验重复性良好,符合试验要求。

3.3 乳酸钙的纯化

3.3.1 镁、铁、铅等金属离子的消除

鉴于鸡蛋壳中除含有大量钙之外,还含有少量的镁、铁、铅等杂质离子,这些金属离子会在人体富集,造成金属离子中毒,给生命健康带来危害。根据氢氧化钙溶度积 3.7×10⁻⁶,氢氧化镁溶度积 1.3×10⁻¹¹,氢氧化铁溶度积为 4×10⁻⁴⁰,氢氧化铅溶度积为 1.2×10⁻¹⁵ 可知,当金属镁离子沉淀完全时,其他杂质离子都已沉淀完全。为了不引入新的杂质,采用氢氧化钙来调节溶液的 pH 值来除杂,pH 为四个水平,10、11、12、13,其余步骤同 2.2.4。除杂体系 pH 对乳酸钙收率影响如图 14。

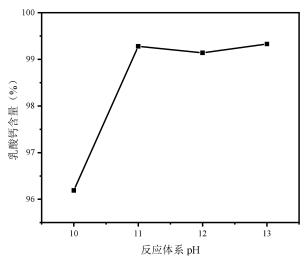


图 14 除杂体系 pH 对乳酸钙收率的影响

图 14 结果表明除杂体系 pH 值为 11 时乳酸钙含量最大,继续增加 pH,乳酸钙含量没有明显变化,且过量 pH 会影响产品的品质,故最终选择 pH 为 11 作为最佳点。

3.3.2 加入不良溶剂乙醇对乳酸钙析出时间的影响

根据乳酸钙易溶于水,不溶于乙醇的特点,在蒸发溶液冷却到室温时,加入不良溶剂乙醇,可使乳酸钙在 10min 内析出。

3.4 乳酸钙产品的表征结果

3.4.1 红外结果分析

产品经红外光谱分析后得图 15。

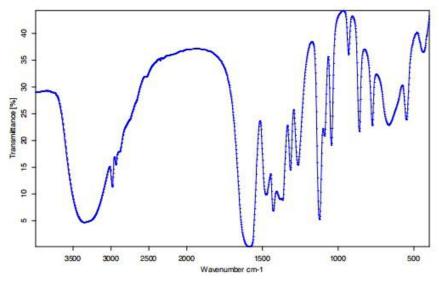


图 15 产品红外光谱分析

由图 15 结果可知,在 3500cm⁻¹-3250cm⁻¹处存在宽且强的吸收峰,说明存在 O-H 缔合的伸缩振动,在 3000cm⁻¹-2800cm⁻¹处存在小而尖的峰,此处为-CH₃ 和 C-H 键的伸缩振动,在和 1575cm⁻¹-1600cm⁻¹处存在强吸收峰,说明存在 C=O 键 的伸缩运动,由于结合了钙离子故向低波数偏移,在 1150cm⁻¹处存在强吸收峰,说明存在酯基 C-O 单键伸缩振动。该表征结果与文献^[14]相符,可以判断合成物质为目标产物。

3.4.2 镁离子定性检验



图 16 乳酸钙除杂前后镁离子定性检验

由图 16 结果可知, 左边是除杂前乳酸钙中镁离子的定性检验, 加入镁试剂

后溶液呈蓝色,说明含有镁离子;右边是除杂后乳酸钙中镁离子的定性检验,加入镁试剂后溶液呈紫色,说明不含镁离子。

3.4.3 铁离子含量测定



图 17 乳酸钙除杂后铁离子的含量测定

由图 17 结果可知,左边是铁离子含量为 0.005%的标准比色溶液的显色,右边是除杂后试样溶液的显色,通过对比,除杂后试样溶液的颜色明显比标准比色溶液浅,说明乳酸钙中铁离子含量<0.005%,符合 GB1886.21—2016 国家标准。

3.4.4 乳酸钙含量的测定

用配合滴定法对产品中乳酸钙含量含量进行测定,结果如表。

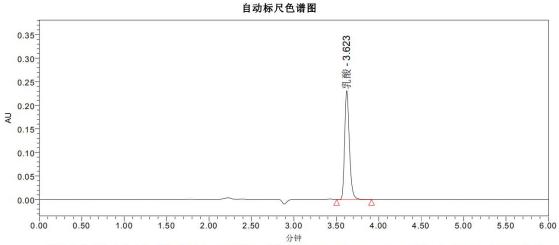
表 3 乳酸钙含量的测定原始记录

样品名称	尔	乳酸钙			测定日期 2021 4		年 5 月 10 日	
方法依护	居 竞	赛组委会提信	共标准	天平2	型号		AL204	
指示液	指示液 钙		旨示剂 试剂		去离子水、产品		品,EDTA 标准滴定溶液	
7	編号	空白	空白		2		3	
	m_1 (g)		(0.0000	0.0000		0.0000	
乳酸钙质量	m_2 (g)		-	-0.1008		.1003	-0.1002	
	△m (g)			0.1008	0.	1003	0.1002	
EDTA	V_1 (mL)	0.00		0.00	(0.00	0.00	
标准液	V ₂ (mL)	0.00		21.18	2	1.20	21.18	
使用体	\ \ \	0.00		21.18	2	1.20	21.18	
积	(mL)	0.00	0.00			1.20	21.10	
$\overline{C}_{EDTA}(m)$	ol • L ⁻¹)		0.02086					
ω ((%)		ç	5.630	96	5.198	96.203	
σ	(%)			9	6.01			
相对平	均偏差%		0.26					
计算	公式	$\omega(\mathcal{C}a^2)$	$\omega(Ca^{2+}) = \frac{c_{\text{EDTA}} \times (V_{\text{EDTA}} - V_0) \times M_{CaL}}{m_{CaL}} \times 100\%$					
		c _{EDTA} -	c _{EDTA} ——EDTA 标准溶液浓度,单位为 mol/L;					
		V _{EDTA} -	V _{EDTA} ——试样消耗 EDTA 标准溶液体积,单位为 L;					
备注		V ₀ —–	V ₀ ——空白样消耗 EDTA 标准溶液体积,单位为 L;					
		M _{CaL} -5	M _{CaL} -乳酸钙摩尔质量(218.2g•mol ⁻¹);					
		m _{CaL} -	乳酸钙试构	羊质量,自	单位为 ;	g;		

滴定结果表明,产品中乳酸钙含量为96.01%,相对平均偏差为0.26%。

3.4.5 液相色谱测定乳酸钙粉末中乳酸含量

用高效液相法对乳酸钙粉末中乳酸含量进行测定,结果如图。



样品名称 粉末浙大宁理_002; 样品瓶 74; 进样 1; 通道 2998 Ch1 208nm@1.2nm; 采集日期 2021-5-18 18:10:39 CST; 处理通道说明 2998 Ch1 208nm@1.2nm

组份结果 保留时间 面积 高度 样品名称 名称 单位 含量 (分钟) (微伏*秒) (微伏) 粉末浙大宁理_002 1 乳酸 3.623 896077 230625 116.279 % 片剂_浙大宁理_002 86416 41.497 %

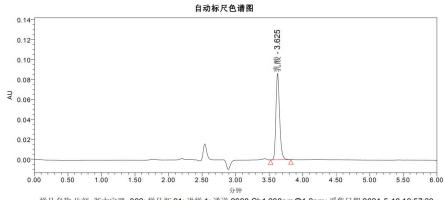
乳酸 3.625 331053

图 18 乳酸钙粉末中乳酸含量的检测

检测结果表明,乳酸钙粉末中乳酸含量116.3%,结果明显高于乳酸钙含量 的滴定结果。原因是我们的产品 110℃烘干了 2h,实际为带 2 个结晶水的乳酸钙, 而举办方是按带五个结晶水的乳酸钙来计算。

3.4.6 乳酸钙咀嚼片乳酸含量的测定

用高效液相法对乳酸钙咀嚼片中乳酸含量进行测定,结果如图。



样品名称 片剂_ 浙大宁理_002; 样品瓶 91; 进样 1; 通道 2998 Ch1 208nm@1.2nm; 采集日期 2021-5-18 19:57:39 CST; 处理通道说明 2998 Ch1 208nm@1.2nm

组份结果

	样品名称	名称	保留时间 (分钟)	面积 (微伏*秒)	高度 (微伏)	含量	单位
1	粉末浙大宁理_002	乳酸	3.623	896077	230625	116.279	%
2	片剂_浙大宁理_002	乳酸	3.625	331053	86416	41.497	%

图 19 乳酸钙咀嚼片中乳酸含量检测

检测结果表明,乳酸钙咀嚼片中乳酸含量为41.50%。

3.6.7 乳酸钙咀嚼片硬度的测定

用片剂四用测定仪对乳酸钙咀嚼片的硬度进行测定,结果如图。



图 20 乳酸钙咀嚼片的硬度

检测结果表明,乳酸钙咀嚼片,硬度达到70.68N,完全达到竞赛标准。

4.结论

- (1)本实验针对木瓜蛋白酶的选择性宽,能有效分解鸡蛋壳内膜和真壳多种蛋白质纤维降低膜壳结合力、不易破坏蛋壳活性成分等特点。采用木瓜蛋白酶+超声辅助法脱壳膜,当酶质量分数为蛋壳粉的 1%,溶液 pH 为 6,固液质量比 1:8,反应温度 65℃,超声时间仅需 40min 时鸡蛋壳回收率为 93.16%,钙含量为 98.31%。该方法反应温和,时间短,对环境友好。
- (2)通过单因素实验研究了反应物物料比,料液质量比,反应温度,反应时间对生成的乳酸钙收率的影响。实验结果表明,脱膜壳粉与乳酸物质的量之比为0.9:2,乳酸与水的质量比为1:12,反应温度35℃,反应时间为80min时乳酸钙收率为83.31%,钙含量为93.59%。通过调节溶液pH为11,析出晶体时加入不良溶剂对乳酸钙进行除杂纯化后,得到白色粉末产品。经红外、液相色谱、钙含量测定等表征,该产品为带有2个结晶水的乳酸钙,收率为96.72%,钙含量为96.01%,乳酸含量为116.3%。
- (3) 将乳酸钙、玉米淀粉和硬脂酸镁以质量比 30:69:1 比例混合、研磨并制成乳酸钙咀嚼片,每片乳酸含量为 41.50%,硬度达到 70.68N,完全达到竞赛标准。

(4) 创新点

采用木瓜蛋白酶+超声辅助法进行鸡蛋壳膜分离,壳膜分离程度高,反应温和,时间短,对环境友好,符合绿色化学理念。

利用乳酸钙易溶于水不溶于乙醇,而杂质乳酸易溶于乙醇的特点,加入不良溶剂乙醇既降低乳酸钙的溶解度,使乳酸钙快速析出,又能达到除去乳酸的双重作用。

此研究结果确定了各阶段较优的工艺条件,对于鸡蛋壳的深加工利用有很大的参考价值,但是由于实验室条件和时间有限,对于较优的工艺条件在生产车间环境下是否有稳定性,还有待进一步研究。

参考文献

- [1]刘林,徐倩,朱相媛等.高温煅烧法利用废弃蛋壳制备乳酸钙的工艺研究[J].西南民族大学学报(自然科学版),2020,46(06):586-594.
- [2]Ye-Kyung Lee, Soon-Dong Kim. Preparation and Characteristics of Calcium Lactate from Black Snail[J]. Preventive Nutrition and Food Science, 2003, 8(2).
- [3]李逢振.木瓜蛋白酶分离蛋壳壳膜研究[J].安徽农业科学,2020,48(19):186-188.
- [4]洪艺萍,粟代莲,王松刚等.超声辅助牡蛎壳制备乳酸钙的工艺优化[J].福建农业科技,2020(06):27-32.
- [5]孙郡.蛋体水解液的益生菌发酵酶解工艺及产品制备研究[J].粮油食品科技,2020,28(03):122-128.
- [6] 黄翔,陶蕾,杨燃等.复合乳酸菌发酵蛋壳制备乳酸钙[J].食品科学,2019,40(20):159-165.
- [7]赵静丽,刘远远,马美湖.不同载体固定化蒙氏肠球菌发酵蛋壳制备乳酸钙[J].食品科学,2020,41(02):80-86.
- [8] 刘德婧, 马美湖. 超声辅助法制备蛋壳源乳酸钙[J]. 中国食品学报,2017,17(06):90-96.
- [9]黄春喜,廖春芳,黄宜辉等.准确快速测定木瓜蛋白酶活性的方法研究[J].轻工科技,2012,28(12):5-6.
- [10]严奉伟,黄芳,吴涛等.二步煅烧法从鸡蛋壳制备乳酸钙工艺[J].食品研究与开发,2011,32(11):27-31.
- [11] 王 永 辉 . 蛋 白 酶 和 肽 酶 在 水 解 蛋 白 质 方 面 的 区 别 [J]. 生 物 学 教 学,2011,36(01):76.
- [12]李涛,马美湖,蔡朝霞.蛋壳中碳酸钙转化为有机酸钙的研究[J].四川食品与发酵,2008(05):8-12.
- [13]白海涛. 鸡蛋壳制备食品级乳酸钙的新工艺研究[D].西北大学,2006.
- [14]N. Kubantseva, R. W. Hartel. SOLUBILITY OF CALCIUM LACTATE IN AQUEOUS SOLUTION[J]. Food Reviews International, 2002, 18(2-3).
- [15] 周先波,魏旻晖,毛红雷等.普通化学实验[M].北京: 化学工业出版社,2013

[16] GB1886.21-2016 食品安全国家标准 食品添加剂 乳酸钙[S].2016.