

MILOŠ B. RAJKOVIĆ<sup>1\*</sup>, IVANA SREDOVIĆ IGNJATOVIĆ<sup>1</sup>,  
LJUBIŠA IGNJATOVIĆ<sup>2</sup>, VIKTOR NEDOVIĆ<sup>1</sup>, SLOBODAN  
PRIJIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd,  
Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:543.544.1:663.4

doi:10.5937/ZasMat1504510R



Zastita Materijala 56 (4)

510 - 521 (2015)

## Određivanje katjona i metala u pivu i sirovinama za proizvodnju piva metodama jonske hromatografije (IC) i atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS)

### IZVOD

U cilju kontrole kvaliteta piva i sirovina za proizvodnju piva u Beogradskoj industriji piva (BIP) primenjene su metode jonske hromatografije (IC) i atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS). Od sirovina za proizvodnju piva analizirana je voda (gradska, tehnološka i demineralizovana). Merenja pH vrednosti ukazala su na povećanu pH vrednost u uzorku tehnološke vode, ali to nije imalo uticaj na ukomljavanje slada pošto su ispitivani uzorci sladovine, kao i uzorci mladog piva i gotovog proizvoda imali pH vrednost u očekivanom opsegu. Analiza sadržaja anjona i katjona u ispitivanim uzorcima vode, pokazala je da je koncentracija ispitivanih anjona ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  i  $PO_4^{3-}$ ) i katjona ( $NH_4^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), kao i mikroelemenata (Fe, Cu i Zn) u granicama propisanim Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće i Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za pivo. Ispitivanje sadržaja anjona u uzorcima sladovine i piva (mladog i gotovog proizvoda) pokazalo je da je sadržaj  $SO_4^{2-}$ - i  $NO_3^-$ -jona bio u preporučenim granicama, koncentracija  $Cl^-$ -jona bila je iznad  $150\text{ mg/dm}^3$ , što može imati uticaj na senzorne karakteristike piva, dok je promena sadržaja  $PO_4^{3-}$ -jona bila neznatna. Pošto je AAS standardna metoda za analizu sadržaja alkalnih i zemnoalkalnih metala, rezultati dobijeni ovom metodom u uzorcima piva uzeti su kao referentni i prema njima je izvršena analiza i upoređivanje rezultata dobijenih metodom IC. Rezultati određivanja Na, Ca i Mg u ispitivanim uzorcima vode, pokazala su odstupanja, ali su obe metode ukazale na povećan sadržaj natrijuma u demineralizovanoj vodi. Sadržaj alkalnih i zemnoalkalnih metala u uzorcima sladovine i piva (mladog i gotovog proizvoda) ukazao je da su rezultati dobijeni ovim dvema metodama bili u saglasnosti.

**Ključne reči:** pivo, jonska hromatografija, atomska apsorpciona spektrofotometrija, teški metali

### 1. UVOD

Pivo je blago alkoholni napitak koji se proizvodi procesom alkoholnog vrenja iz slada, hmelja, vode i pivskog kvasca [1,2]. Pod pojmom piva danas se podrazumeva veliki broj proizvoda koji se po svojim senzornim svojstvima često jako razlikuju [3]. Svi oni se proizvode od tipičnih pivarskih sirovina. Zavisno od vrste primenjenog kvasca, koji se koristi za fermentaciju, piva se mogu podeliti na: piva „donjeg vrenja“ i „gornjeg vrenja“, lager piva, odnosno „Ale“ i „Alt“ piva [4-8]. Pivo poseduje niz fizioloških i terapijskih svojstava i ako se unosi u umerenoj količini povoljno deluje na organizam [9].

Proizvodnja piva je jedna od najstarijih biotehnologija. Od jednostavne recepture u tehnologiji proizvodnje piva došlo se do savremene tehnologije u kojoj su primenjena najnovija znanja i iskustva biohemijskog, hemijskog, genetskog i procesnog inženjerstva.

Cilj ovog rada je primena instrumentalnih metoda jonske hromatografije (IC) i atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) radi određivanja hemijskih i fizičko-hemijskih parametara kvaliteta piva i sirovina za proizvodnju piva. Ispitan je sadržaj neorganskih anjona i katjona alkalnih, zemnoalkalnih metala i mikroelemenata (Fe, Cu, Zn) u pivu i sirovinama za proizvodnju piva. Od sirovina za proizvodnju analizirana je voda, a promena navedenih parametara kvaliteta ispitivana je analizom uzoraka sladovine, ohmeljene sladovine, mladog piva i gotovog proizvoda. U radu je ispitan uzorak kukuruznog griza („surogat“) koji se koristi kao zamena za određeni procenat ječmenog slada.

\*Autor za korespondenciju: Miloš Rajković

E-mail: rajmi@agrif.bg.ac.rs

Rad primljen: 14. 07. 2015.

Rad prihvaćen: 10. 09. 2015.

Rad je dostupan na sajtu: [www.idk.org.rs/casopis](http://www.idk.org.rs/casopis)

## 2. MATERIJAL I METODE RADA

U ovom radu analizirani su uzorci gradske, tehnološke i demineralizovane vode, kao i uzorci sladovine i piva sa ispitivane proizvodne linije Beogradske industrije piva (BIP), Beograd tokom 2013. godine. Broj i opis uzoraka dat je u tabeli 1.

*Merenje pH vrednosti:* Aparatura za merenje pH vrednosti sastojala se od pH-metra (*Eutech*, Holandija), kombinovane pH elektrode i magnetne mešalice. Standardni puferi bili su: pH = 10,00; pH = 7,00 i pH = 4,00 [10].

*Određivanje provodljivosti:* Sva merenja su rađena na *ToA CM, CM-40S conductivity meter (ToA electronics ltd.)* sa elektrodom od Pt za laboratorijsku multivarijantnu analizu. Uređaj je najpre kalibrisan pomoću standardnih rastvora za kalibraciju (provodljivosti: 814  $\mu\text{S}/\text{cm}$  i 1413  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

*Određivanje katjona i anjona jonskom hromatografijom (IC) [11]:* Instrument korišćen u ovom radu je *Metrohm, 761 Compact IC*. Separaciona kolona za razdvajanje anjona je *Metrosep A supp 1- 250 (6.1005.300)*. Pretkolona korišćena u radu je *IC Anion Precolumn SUPERSEP (6.1009.010)*. Kao mobilna faza za razdvajanje anjona na ovoj koloni korišćen je rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  koncentracije 3  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ . Protok mobilne faze je bio 1  $\text{cm}^3/\text{min}$ , vreme analize 20 minuta, a injektirana zapremina 20  $\mu\text{L}$ . Separaciona kolona za razdvajanje katjona je *Metrosep C2-150*. Mobilna faza za razdvajanje katjona je bila smeša vinske kiseline, koncentracije 4  $\text{mmol}/\text{dm}^3$  i dipikolinske kiseline, koncentracije 0,75  $\text{mmol}/\text{dm}^3$ . Protok mobilne faze je bio 1  $\text{cm}^3/\text{min}$ , vreme analize 20 minuta, a injektirana zapremina 20  $\mu\text{L}$ . Da bi se precizno odredila koncentracija anjona i katjona u rastvoru, konstruisana je kalibraciona kriva, koja prikazuje koncentracije standardnih rastvora anjona, odnosno katjona u odnosu na njihove odgovarajuće površine, a površine se izračunavaju prema hromatografu načinjenom prema njihovim specifičnim provodljivostima (u  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). U cilju uklanjanja rastvorenih gasova i razaranja koloidnih čestica, uzorci sladovine i piva su za analizu jonskom hromatografijom pripremani na sledeći način. Uzorak, određene zapremine je najpre tretiran ultrazvukom, dva puta po deset minuta, a potom degaziran dva puta po pet minuta. Nakon degazacije, uzorci za analizu anjona su razblaženi, destilovanom vodom deset puta i tako razblaženi analizirani jonskom hromatografijom. Za analizu katjona, pri razblaživanju u uzorke je dodato 50  $\mu\text{L}$   $\text{HNO}_3$ , koncentracije 1  $\text{mol}/\text{dm}^3$ . Potom su tako pripremljeni uzorci za analizu katjona i anjona, filtrirani kroz kvantitativnu filter hartiju (Filtrak 390). Uzorci i standardi su pre puštanja na hromatograf filtrirani kroz membranski špric filter od 0,45 mikrona.

*Određivanje metala metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS) [12-14]:* Za određi-

vanje metala metodom atomske apsorpcione spektrometrije korišćeni su standardni rastvori jona metala (K, Na, Mg, Ca, Fe, Cu i Zn), a kao slepa proba korišćena je ultra čista voda.

Tabela 1 - Opis uzoraka koji su analizirani u ovom radu

Broj uzorka	Opis uzorka
uzorak 1.	Gradska voda
uzorak 2.	Tehnološka voda
uzorak 3.	Demineralizovana voda
uzorak 4.	Kongresna sladovina koja se dobija ukomljavaњem slada
uzorak 5.	Ohmeljena sladovina (separacija 285): dodatkom hmelja u toku kuvanja dolazi do ekstrakcije rastvorljivih sastojaka i njihove termicke transformacije. Ekstrahuju se gorke komponente ( $\alpha$ -kiseline) i termički transformišu u jedinjenja karakteristične gorčine (izo- $\alpha$ -kiseline), hmeljna ulja, aromatične komponente i tanini
uzorak 6.	Ohmeljena sladovina (separacija 286): ekvivalent prethodnom uzorku
uzorak 7.	Surogat, kukuruzni griz: koristi se, jer se u većini delova sveta deo slada zamenjuje jeftinijim sirovinama "surogatima". To mogu biti različite nesladovane žitarice i proizvodi dobijeni njihovom preradom, ali i šećer i šećerni sirupi, skrobni sirupi, kojima se relativno lako povećava količina dobijenog ekstrakta, a samim tim i kapacitet proizvodnje
uzorak 8.	Mlado pivo (separacija 285): po završetku glavnog vrenja, kada prevri najveći deo fermentabilnog ekstrakta, dobijamo mlado pivo koje se dalje hladi do temperature ispod 10°C, nakon čega počinje naknadno vrenje i odležavanje. Ovaj uzorak je dobijen od separacije 285
uzorak 9.	Mlado pivo (separacija 286): ekvivalent prethodnom uzorku, ali dobijen od separacije 286
uzorak 10.	Pivo: pasterizovan gotov proizvod
uzorak 11.	Pivo: nepasterizovan gotov proizvod

\*Separacije broj 285 i 286 predstavljaju redni broj kuvanja sladovine (vodi se evidencija u toku godine-2013). Uzorci sladovine i piva su, pre merenja pH i potenciometrijskih titracija, degazirani ultrazvučno i mešanjem na magnetnoj mešalici.

U standardnim rastvorima i uzorcima podešena je pH vrednost (na 2,0) dodavanjem rastvora  $\text{HNO}_3$  koncentracije 1  $\text{mol}/\text{dm}^3$ . Sva merenja su rađena na atomskom apsorpcionom spektrofotometru sa plamenom tehnikom *SOLAAR S4 - Thermo England*. Pre početka analize, pristupa se uključivanju aparata i potrebnih šupljih katoda metala koji se određuju, zatim zagrevanju 10 do 30 minuta, uključujući i deuterijumsku lampu za pozadinsku kore-

kciju, a nakon toga se pristupa analizi, uz prethodnu kalibraciju, aspiriranjem navedenih standardnih rastvora u raspršivač aparata. Savremeni uređaj, kao što je korišćeni *Solaar S4*, crtaju softverski kalibracionu krivu i određuju koncentraciju ispitivanog metala u uzorku, nakon što se izvrši aspiriranje uzorka u raspršivač.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

Određivanje alkaliteta, aciditeta i moći puferovanja u uzorcima sladovine, surogata od kukuruznog griza i piva prikazano je u našim prethodnim radovima [15,16]

#### 3.1. Određivanje pH vrednosti i provodljivosti u uzorcima sladovine, surogata od kukuruznog griza i piva

pH vrednost sladovine i piva znatno utiče na stabilnost procesa proizvodnje i tehnološko-senzorne karakteristike piva [17-19]. Vrednost pH je od najvećeg značaja, jer većina reakcija koje se odvijaju tokom proizvodnje slada i piva direktno zavise od pH vrednosti. Uticaj pH vrednosti u toku procesa kuvanja i vrenja malo je poznat.

Rezultati određivanja pH vrednosti i provodljivosti u uzorcima sladovine, kukuruznog griza i piva prikazani su u tabeli 2.

Optimalna vrednost pH sladovine je između 5,4 i 5,8, dok je u uzorku ispitivane kongresne sladovine pH bila 5,90. Svako smanjenje kiselosti sladovine ima sledeća negativna dejstva: opadanje aktivnosti enzima, smanjenje iskorišćenja ekstrakta, promenu karakteristika sladovine, promenu profila gorčine i usporavanje vrenja. U uzorcima ohmeljene sladovine pH vrednost iznosila je 5,20. Svako povećanje kiselosti sladovine ima sledeća pozitivna dejstva: povećan ukupan rastvorni azot i slobodan amino-azot, povećan ekstrakt sladovine, povećana brzina ceđenja sladovine, smanjena ekstrakcija tanina, itd.

Tabela 2 - Određivanje vrednosti pH i provodljivosti u uzorcima sladovine, kukuruznog surogata i piva

Uzorak	t, °C	pH	$\kappa$ , $\mu\text{S/cm}$
4	23,4	5,90	1175
5	23,2	5,20	1498
6	23,0	5,20	1488
7	22,8	5,93	762
8	23,6	4,47	1460
9	23,6	4,47	1480
10	24,7	4,32	1381
11	25,3	4,37	1448

U uzorcima mladog piva, pH vrednost se u odnosu na sladovinu smanjuje za oko jednu pH jedinicu. U ispitivanim uzorcima 8 i 9, pH vrednost je iznosila 4,47. Kiselost mladog piva se povećava u odnosu na sladovinu tokom tehnološkog postupka kako bi se obezbedili optimalni uslovi za dejstvo različitih enzima. Nakon odležavanja i pasterezacije, pH vrednost finalnog proizvoda je iznosila 4,32 za pasterizovani uzorak, odnosno 4,37 za nepasterizovani uzorak, što je u oblasti očekivanih vrednosti.

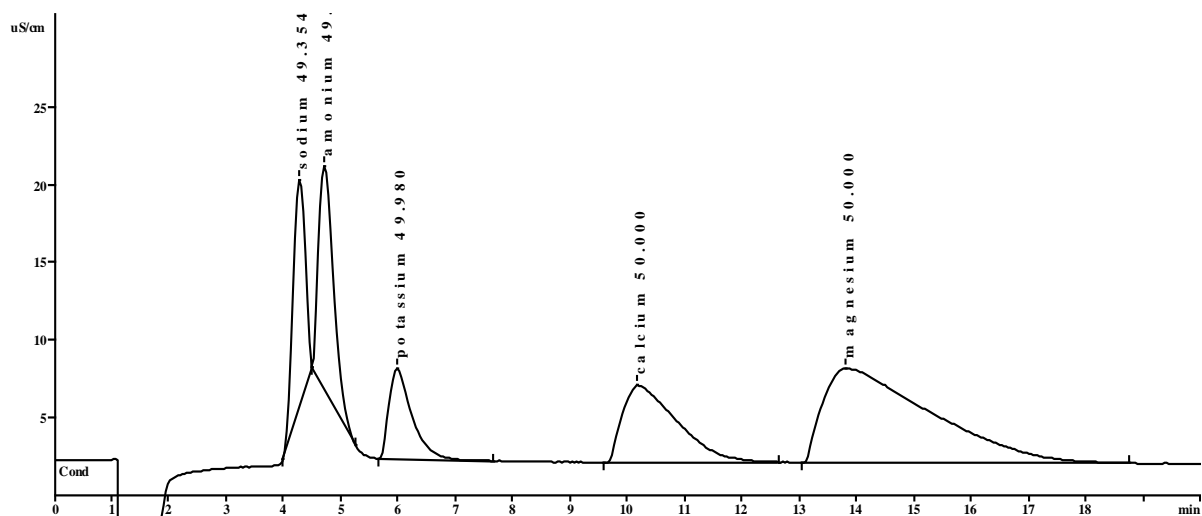
Provodljivost uzorka kongresne sladovine uslovljena je prisustvom jonskih supstanci koje potiču iz ječma, čijim klijanjem nastaje slad i vode kojom se potom taj slad tretira. Ohmeljena sladovina dobija se dodatkom hmelja u kongresnu sladovinu tokom kuvanja. Ispitivanjem provodljivosti ohmeljene sladovine uočava se povećanje njene provodljivosti u odnosu na kongresnu sladovinu. Veća provodljivost ohmeljene sladovine uslovljena je rastvaranjem mineralnih materija iz hmelja. U uzorcima mladog piva, dobijenog nakon fermentacije ohmeljene sladovine, zapaženo je neznatno smanjenje provodljivosti u odnosu na ohmeljenu sladovinu, što se objašnjava time da mineralne materije tokom fermentacije imaju ulogu u pokretanju i održavanju metabolizma kvasca. Tokom odležavanja mladog piva, dolazi do izdvajanja taloga, nakon čega se dobija finalni proizvod - pivo. Uzorci pasterizovanog i nepasterizovanog piva imaju provodljivost nižu u odnosu na uzorke mladog piva, što je posledica izdvajanja mineralnih materija u obliku slabo rastvornih jedinjenja.

Kukuruzni griz, koji predstavlja „surogat“ u proizvodnji sladovine i, u odnosu na sladovinu od ječmenog slada, ima znatno manju provodljivost, što ukazuje na manji sadržaj jonskih supstanci u njemu. Kukuruzni griz se, u postupku proizvodnje, koristi kao zamena dela ječmenog slada, kako bi se obezbedio određeni procenat ekstrakta radi ekonomičnosti proizvodnje.

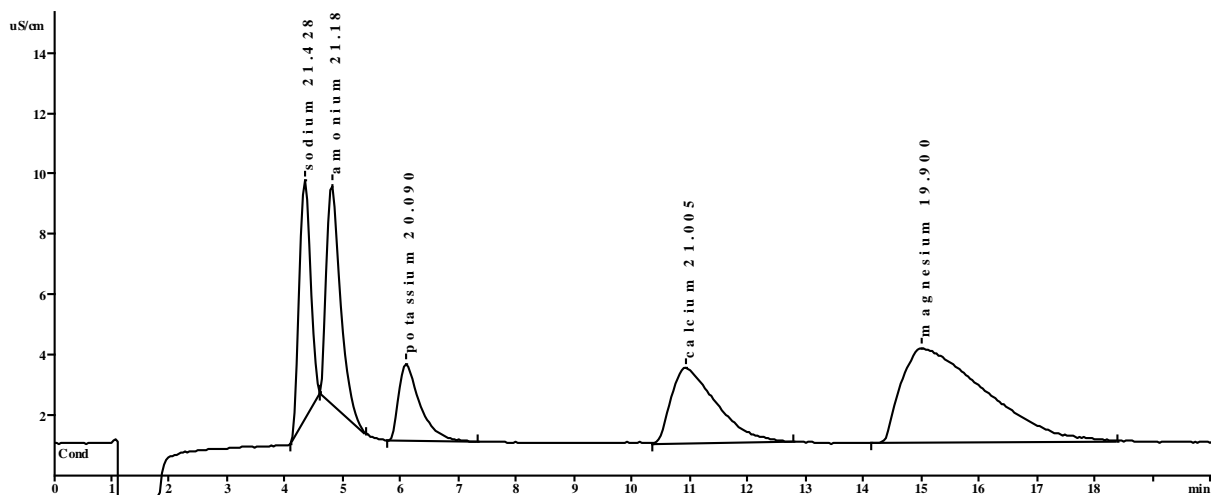
Na slikama 1 i 2 prikazani su jonski hromatogrami dva standardna rastvora neorganskih katjona, od ukupno pet koji su korišćeni za kalibraciju.

Na osnovu kalibracije dobijene su kalibracione krive, koje predstavljaju zavisnost koncentracije ( $c$ ) ispitivanih jona ( $\text{mg/dm}^3$ ) od površine pika ( $A$ ). Sa slika 1. i 2, na osnovu razlike u retencionim vremenima vidi se da su pikovi ispitivanih neorganskih katjona dobro razdvojeni, i da se mogu koristiti u analitičke svrhe.

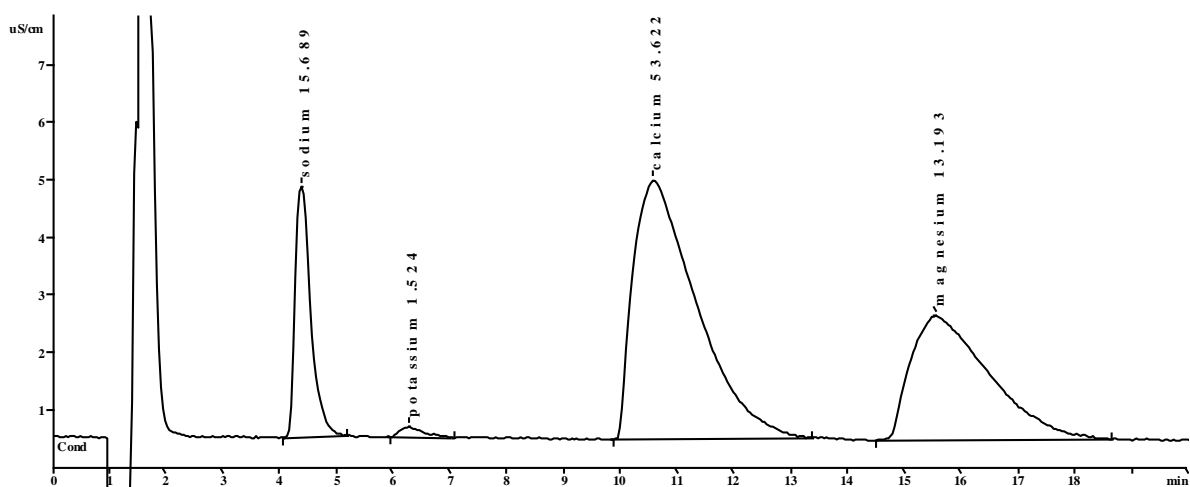
Hromatogrami uzoraka vode, kongresne sladovine, ohmeljene sladovine, mladog piva, kao i pasterizovanog i nepasterizovanog finalnog proizvoda – piva prikazani su na slikama 3 - 13.



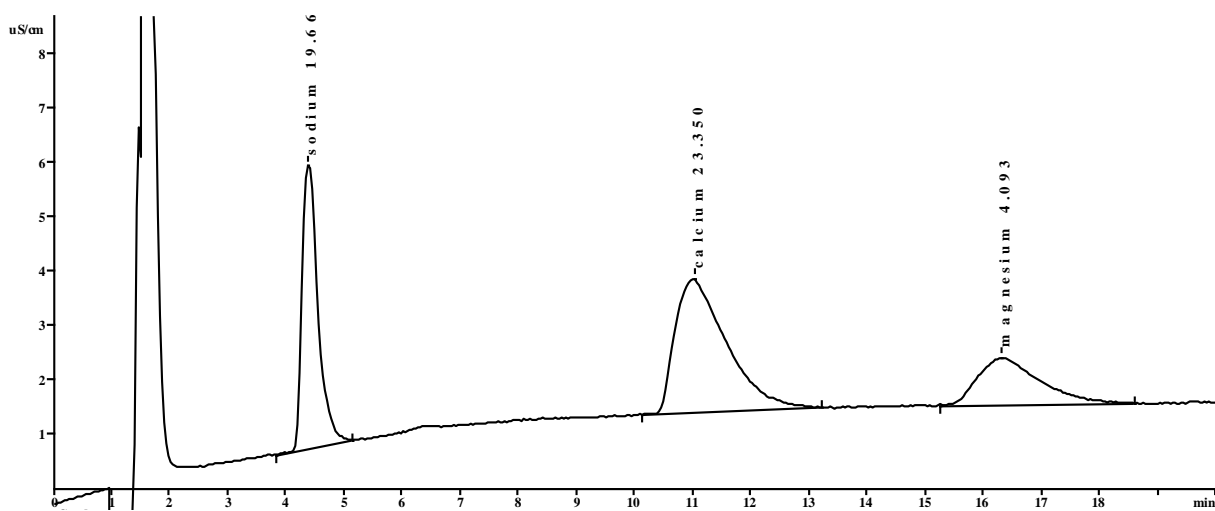
Slika 1 - Hromatogram kalibracionog rastvora 1



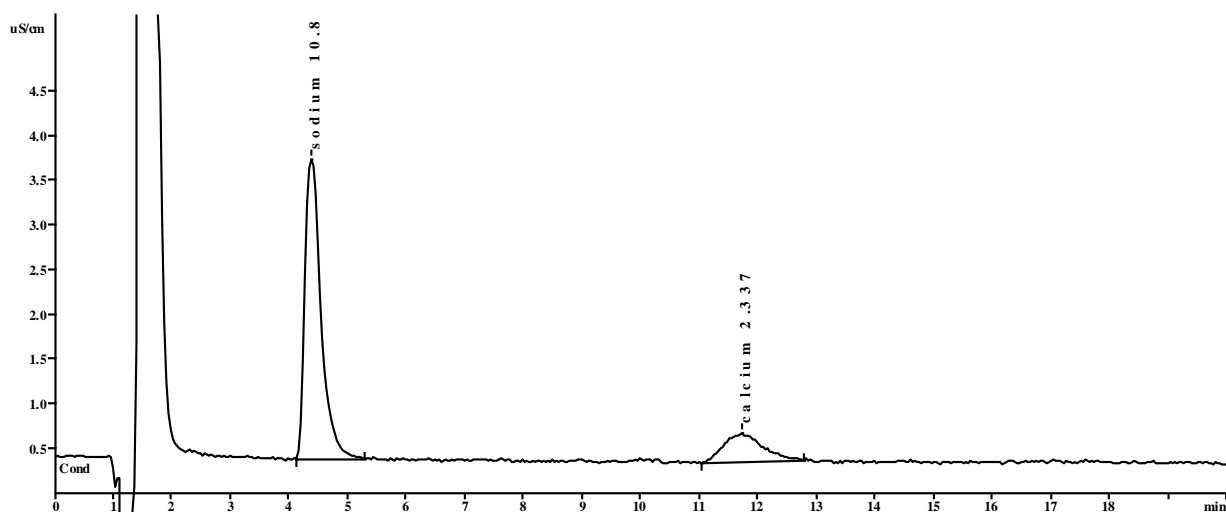
Slika 2 - Hromatogram kalibracionog rastvora 2



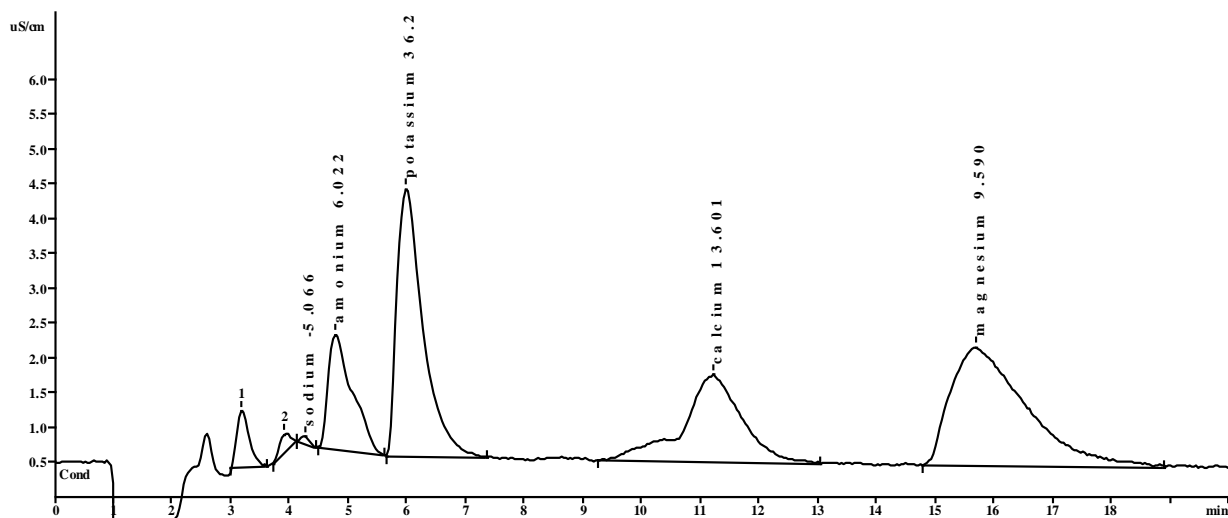
Slika 3 - Hromatogram uzorka 1 (gradska voda)



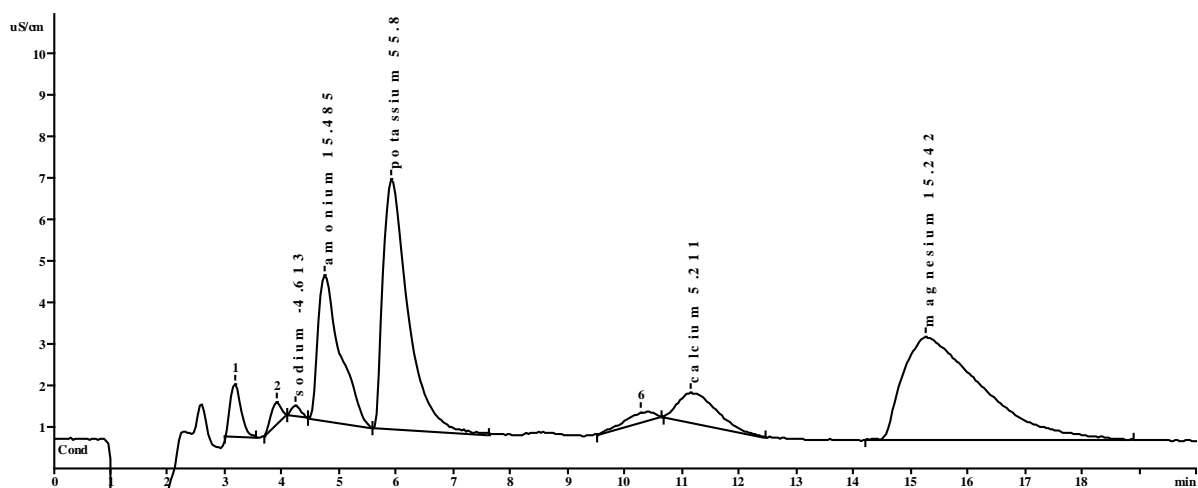
Slika 4 - Hromatogram uzorka 2 (tehnološka voda)



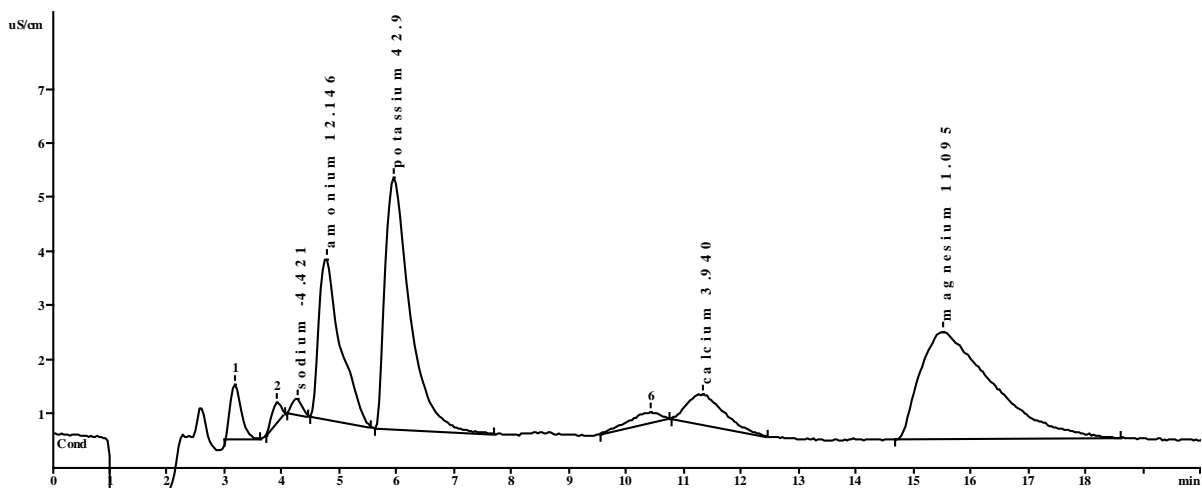
Slika 5 - Hromatogram uzorka 3 (demineralizovana voda)



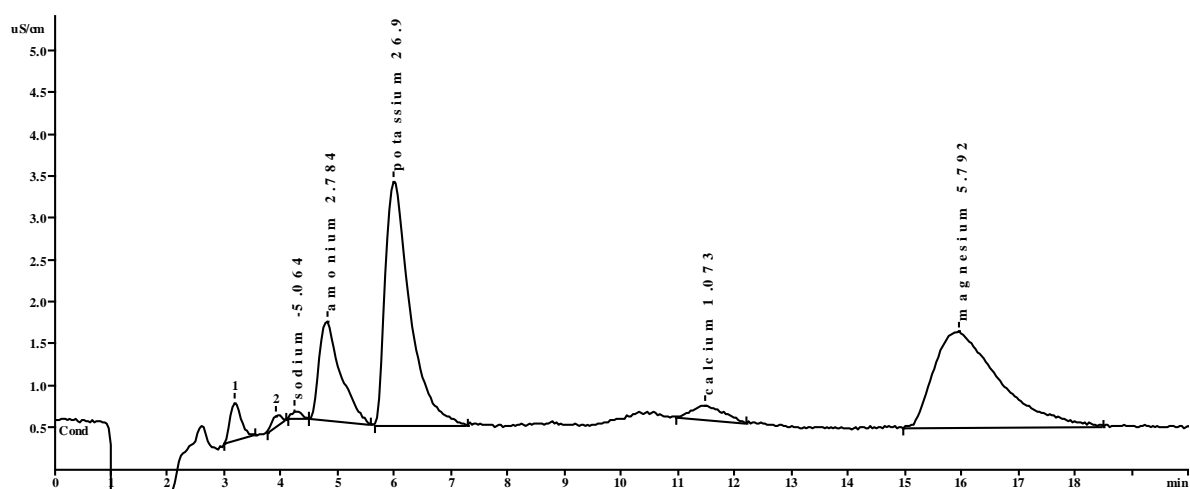
Slika 6 - Hromatogram uzorka 4 (kongresna sladovina)



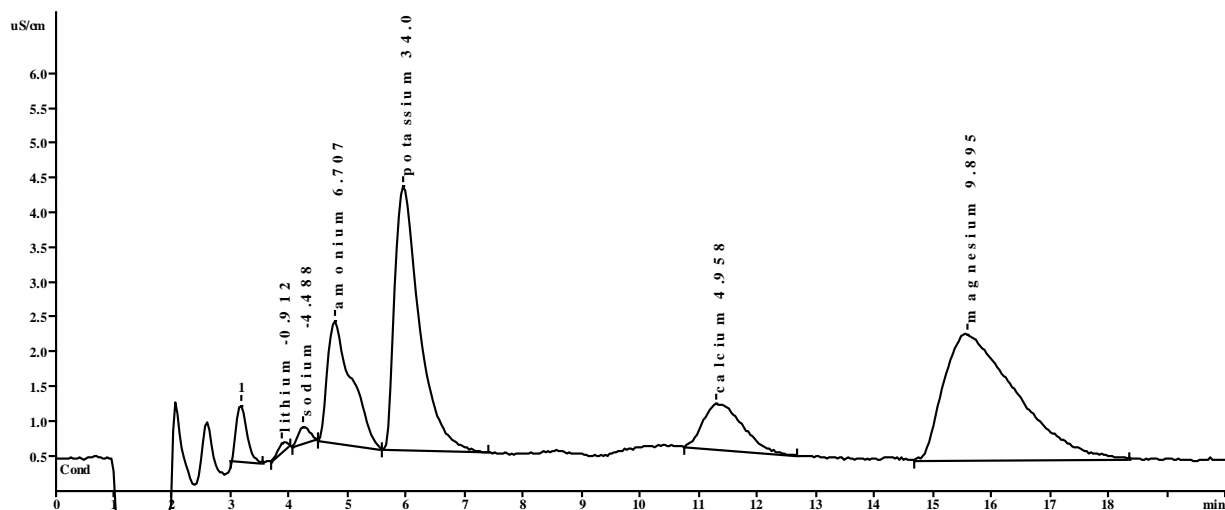
Slika 7 - Hromatogram uzorka 5 (ohmeljena sladovina, separacija 285)



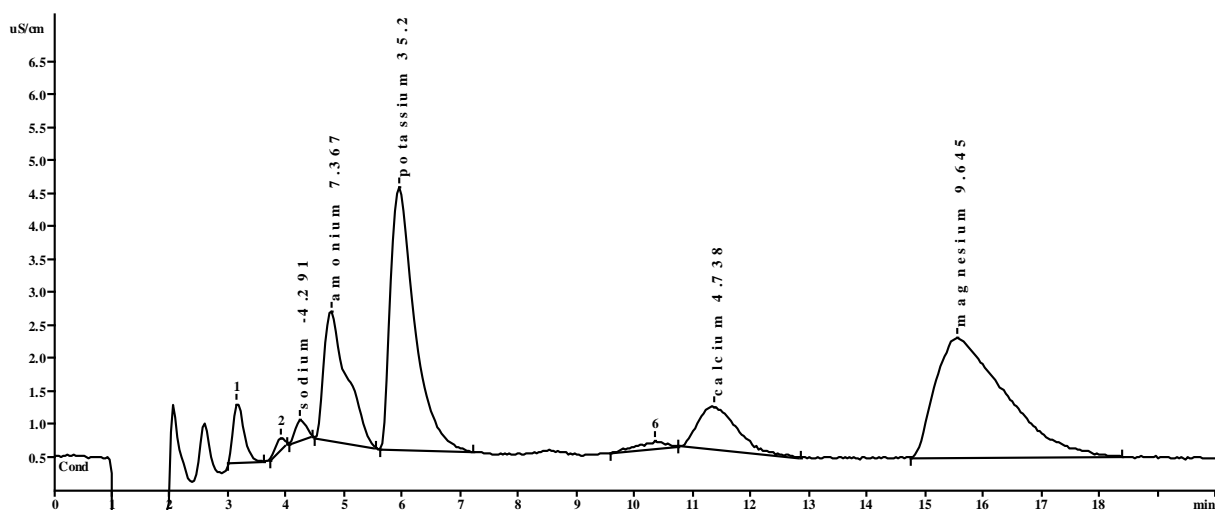
Slika 8 - Hromatogram uzorka 6 (ohmeljena sladovina, separacija 286)



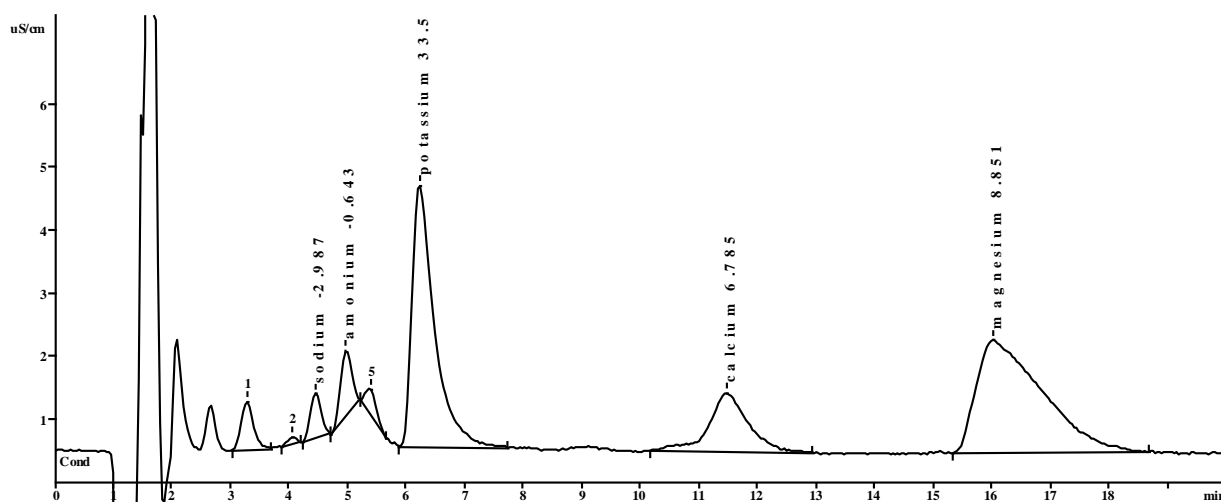
Slika 9 - Hromatogram uzorka 7 (surogat od kukuruznog griza)



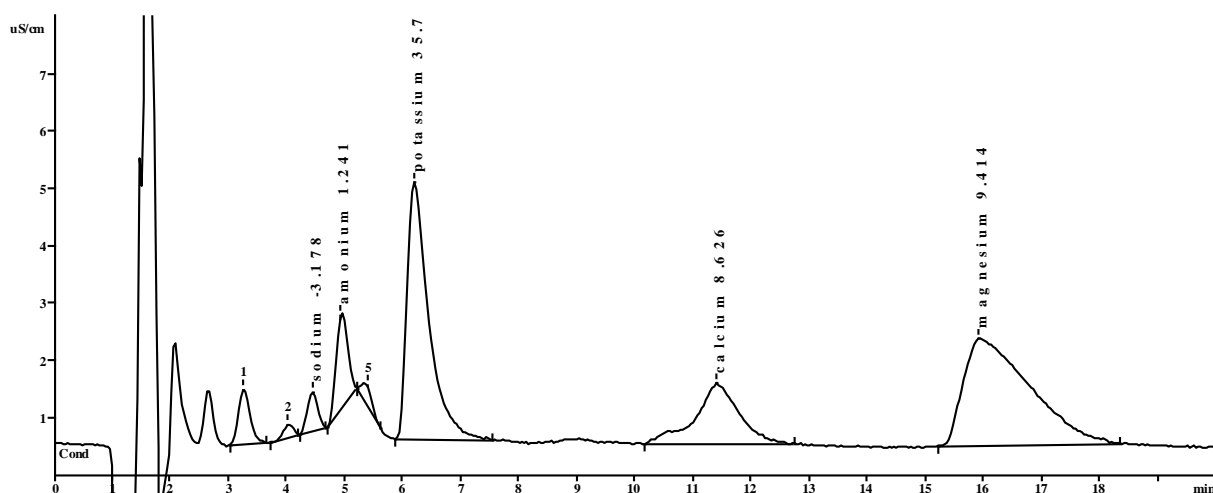
Slika 10 - Hromatogram uzorka 8 (mlado pivo, separacija 285)



Slika 11 - Hromatogram uzorka 9 (mlado pivo, separacija 286)



Slika 12 - Hromatogram uzorka 10 (pasterizovano pivo)



Slika 13 - Hromatogram uzorka 11 (nepasterizovano pivo)

Rezultati određivanja sadržaja katjona metodom jonske hromatografije i atomske apsorpcione spektrometrije su prikazani u tabeli 3.

Analizom rezultata dobijenih metodom AAS prikazanih u tabeli 3. uočava se povećanje sadržaja natrijuma u tehnološkoj vodi u odnosu na gradsku vodu čijom obradom se dobija. Dalja analiza rezultata ukazuje na povećan sadržaj jona natrijuma u

demineralizovanoj vodi, što jasno ukazuje na oslabljeno dejstvo jonskih izmenjivača u postupku obrade i pripreme vode za proizvodnju. Poređenje rezultata određivanja sadržaja natrijuma metodama IC i AAS uočava se odstupanje, pri čemu su koncentracije određene metodom IC nešto više za uzorke gradske i tehnološke vode u odnosu na koncentraciju određenu metodom AAS.

Tabela 3 - Sadržaj katjona u ispitivanim uzorcima određen metodama IC i AAS

Uzorak	IC					AAS			
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
	mg/dm <sup>3</sup>								
1	<0,05	1,52	15,7	13,2	53,6	1,55	10,8	24,5	71,0
2	<0,05	<0,05	19,7	4,09	23,4	0,49	12,8	11,7	22,0
3	<0,05	<0,05	10,8	<0,05	2,34	0,09	15,5	20,5	1,31
4	60,2	363		95,9	136	345	5,28	108	24,1
5	155	558		152	52,1	369	13,8	142	66,7
6	121	429		111	39,4	371	14,2	117	63,5
7	27,8	269		57,9	10,7	230	3,15	62,9	16,9
8	67,1	340		99,0	49,6	307	15,0	115	61,5
9	73,7	352		96,5	47,4	323	15,0	110	58,3
10	6,00	336		88,5	67,9	303	15,6	103	51,4
11	12,4	357		94,1	67,9	318	15,8	107	60,3
MDK (mg/dm <sup>3</sup> )	0,5		<150	<30	20-150				

Skraćenice korišćene u tabeli 3: IC – jonska hromatografija, AAS – atomska apsorpciona spektrofotometrija, MDK – maksimalno dozvoljena koncentracija

Natrijum pri koncentracijama ispod 150 mg/dm<sup>3</sup>, doprinosi punoći i slatkastom ukusu piva. U prisustvu povećanih koncentracija Cl<sup>-</sup>-jona, natrijum u koncentracijama od oko 150 mg/dm<sup>3</sup> izaziva dobijanje piva oslanog, širokog ukusa. Uprkos svemu ovome, ponekad se u kominu dodaje 75-150 mg/dm<sup>3</sup> natrijum-hlorida, kako bi se poboljšala punoća ukusa piva. Fiziološki, u metabolizmu ćelija kvasca natrijum igra određenu ulogu u regulaciji

transporta kalijuma. U uzorku sladovine koncentracija natrijuma je niska i iznosi oko 5 mg/dm<sup>3</sup>.

Nakon ohmeljavanja sladovine, kao i daljim tehnološkim postupkom, na osnovu rezultata AAS, sadržaj natrijuma se ne menja i u proseku je oko 15 mg/dm<sup>3</sup> (uzorci 5 do 11). Analizom hromatograma prikazanih na slikama 6-13 uočava se veliki broj pikova, koji odgovaraju supstancama koje eluiraju na početku hromatografske analize. U tom



početnom periodu se vrši i razdvajanje, odnosno eluiranje  $\text{NH}_4^+$ - i  $\text{Na}^+$ -jona. Kako su pikovi koji odgovaraju  $\text{Na}^+$ -jonu prema hromatografskoj analizi slabo razdvojeni, sadržaj  $\text{Na}^+$ -jona nije mogao da se odredi metodom IC.

Amonijum-jon je pokazatelj zagađenja vode. U ispitivanim uzorcima vode sadržaj  $\text{NH}_4^+$ -jona određen je metodom IC, a na osnovu rezultata vidi se da je ispod granice detekcije. Amonijum-joni izazivaju probleme u proizvodnji piva i umanjuju redukciju nitrata u nitrite.

Rezultati određivanja sadržaja  $\text{NH}_4^+$ -jona u uzorcima sladovine, ohmeljene sladovine, kukuruznog griza, kao i u uzorcima piva nisu pouzdani, pošto je pri niskim koncentracijama natrijuma otežano hromatografsko razdvajanje  $\text{Na}^+$ - i  $\text{NH}_4^+$ -jona jer ova dva katjona imaju sličan koeficijent razdvajanja na korišćenju hromatografskoj koloni. S druge strane, izgled pika (slike 6-13) za  $\text{NH}_4^+$ -jon, ukazuju da sa ovim jonom eluiraju još neki katjoni i razdvajanje na hromatografskoj koloni nije kvalitativno, pa su time rezultati dodatno nepouzdati.

Kalcijum u proizvodnji piva ima osnovnu ulogu sa aspekta prolazne i stalne tvrdoće vode [15,16]. Određivanje sadržaja kalcijuma u ispitivanim uzorcima vode pokazuje odstupanja u rezultatima dobijenim metodom IC i AAS. Uočeno je da je ovo odstupanje manje što je sadržaj kalcijuma u uzorku vode niži.

Najveće odstupanje u analizi kalcijuma metodom IC i AAS je za uzorak sladovine. Kalcijum obično taloži fosfate tokom proizvodnje piva što smanjuje pH vrednost, pa je uobičajeno da se na pH vrednost utiče dodavanjem soli kalcijuma. Sa ovog aspekta tehnologije proizvodnje piva logičniji rezultat bi bio onaj koji je dobijen metodom IC, pošto se soli kalcijuma dodaju u sladovinu radi regulisanja pH vrednosti. Dalje, u prilogu dejstava na pH vrednost,  $\text{Ca}^{2+}$ -joni imaju i sledeće uticaje: stabilizovanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, podsticanje aktivnosti protolitičkih i amilolitičkih enzima, taloženje oksalata, sprečavanje mutnoće i penušanja, poboljšanje toplog taloga. U vezi sa tim je i sadržaj kalcijuma u ohmeljenoj sladovini, koji je u donosu na sladovinu niži, a jedan od razloga je i taloženje kalcijum-oksalata tokom hlađenja ohmeljene sladovine. Na osnovu rezultata iz tabele 3. sadržaj kalcijuma određen metodom AAS u uzorcima mladog piva, kao i u uzorcima gotovog proizvoda je približan. Pri tome treba naglasiti da je sadržaj kalcijuma u gotovom proizvodu nešto niži nego u uzorcima mladog piva.

Slična razmatranja se dobijaju analizom rezultata dobijenih metodom IC i hromatograma prikazanih na slikama 6-13. Detaljnija analiza hromatograma, ukazuje na neidentifikovani pik supstance koja eluira neposredno pre jona kalcijuma. Za uzorke 4, 8 i 9 pikovi neidentifikovane katjonske

supstance i jona kalcijuma su hromatogramski razdvojeni, što omogućava kvantitativnu analizu sadržaja jona kalcijuma, a time i manje odstupanje u rezultatima dobijenim metodama IC i AAS. Za uzorke 5, 6, 10 i 11 nije postignuto razdvajanje jona kalcijuma i neidentifikovane supstance, pa se u obradi rezultata vrši integraljenje ova dva pika kao jednog. Preklapanjem ovih pikova, dobija se veća površina pika, a time i viša koncentracija jona kalcijuma za uzorke 10 i 11 od one koja je dobijena metodom AAS. Potrebno je naglasiti da su uzorci 5, 6, 10 i 11 u više ponavljanja hromatografski analizirani, ali razdvajanje pikova neidentifikovane supstance i  $\text{Ca}^{2+}$ -jona nije postignuto.

Na osnovu rezultata ispitivanja, uzorci sladovine, mladog piva i finalnog proizvoda imaju sadržaj kalcijuma koji odgovara preporučenom opsegu sadržaja  $\text{Ca}^{2+}$ -jona koji je, prema tipu piva, između 20 i 150  $\text{mg}/\text{dm}^3$ .

Sadržaj  $\text{Mg}^{2+}$ -jona u uzorcima vode, određen metodom AAS ukazuje na povećanje koncentracije magnezijuma u demineralizovanoj vodi u odnosu na tehnološku vodu. Ovakav rezultat, ponovo ukazuje na oslabljen rad jonskih izmenjivača koji se koriste u obradi i pripremi vode za proizvodnju piva. Magnezijum u pivu uglavnom potiče iz slada, pa se koncentracija magnezijuma u tehnološkoj vodi koriguje na koncentraciju do 10  $\text{mg}/\text{dm}^3$ , a dobijeni rezultati ukazuju da je taj zahtev ispunjen. Magnezijum u tehnologiji proizvodnje piva ima sličnu ulogu u regulisanju pH vrednosti kao i kalcijum ali, zbog delimične rastvorljivosti soli magnezijuma, njegovo dejstvo je manje naglašeno. Većina magnezijumovih soli su gorka jedinjenja, što znači da bi višak mogao imati negativno dejstvo na ukus piva. Joni magnezijuma su važan kofaktor u metabolizmu fermentacije šećera, naročito su značajni kod fermentacije sladovine sa visokim sadržajem ekstrakta. Koncentracije magnezijuma iznad 30  $\text{mg}/\text{dm}^3$  treba izbegavati. Rezultati određivanja sadržaja magnezijuma metodama IC i AAS su u dobroj korelaciji. Prosečna koncentracija magnezijuma određena metodom IC je oko 95  $\text{mg}/\text{dm}^3$ , dok je prosečan sadržaj određen metodom AAS oko 110  $\text{mg}/\text{dm}^3$ . Znatno viša koncentracija jona magnezijuma i metodom IC i metodom AAS je utvrđena u uzorku ohmeljene sladovine, koji je dobijen separacijom 285.

Sa sladom se u kominu unosi do 500  $\text{mg}/\text{dm}^3$  kalijuma, pa je zato njegov sadržaj u vodi koja se koristi za proizvodnju piva od manjeg značaja. U uzorku gradske vode sadržaj kalijuma određen obema metodama je u korelaciji, dok je u uzorcima tehnološke i demineralizovane vode koncentracija  $\text{K}^+$ -jona, određena metodom IC, bila ispod granice detekcije. Kalijum u procesu proizvodnje daje pivu slan ukus u visokim koncentracijama i ima inhibi-

torno dejstvo na klijanje ječma, dok je, sa druge strane, neophodan za metabolizam fosfora i aktivni transport kroz ćelijski zid. Sadržaj kalijuma u uzorcima od 4 do 11 određen metodama IC i AAS je u dobroj saglasnosti, osim za uzorke ohmeljene sladovine, gde je metodom IC dobijena viša koncentracija  $K^+$ -jona nego metodom AAS. Analizirajući rezultate određivanja kalijuma metodom AAS uočava se povećanje sadržaja u uzorcima ohmeljene sladovine u odnosu na uzorak sladovine. Tokom daljeg tehnološkog postupka sadržaj kalijuma se smanjuje tako da u mladom pivu i finalnom proizvodu u proseku iznosi  $310 \text{ mg/dm}^3$ .

Upoređujući dobijene rezultate za uzorak kongresne sladovine i uzorak kukuruznog griza („surogat“) uočava se da je sadržaj svih ispitivanih katjona niži u odnosu na njihov sadržaj u sladovini. Ovakav rezultat je i očekivan s obzirom na mineralni sastav sirovine od koje se proizvodi kukuruzni griz.

U ovom radu ispitan je i sadržaj mikroelemenata Fe, Cu i Zn. Pomenuti mikroelementi u nižim koncentracijama povoljno utiču na metabolizam kvasca, dok su povišene koncentracije nepovoljne sa aspekta tehnološkog postupka proizvodnje. Sadržaj mikroelemenata u ispitivanim uzorcima određen je metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), a rezultati su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4 - Određivanje sadržaja Fe, Cu i Zn

Uzorak	ispitivani metal (u $\text{mg/dm}^3$ )		
	Fe	Cu	Zn
1	0,06	< 0,02	0,017
2	< 0,05	< 0,02	0,024
3	< 0,05	< 0,02	0,005
4	0,07	0,96	0,452
5	0,24	< 0,02	0,211
6	0,07	< 0,02	0,173
7	< 0,05	0,95	0,409
8	< 0,05	< 0,02	< 0,005
9	< 0,05	< 0,02	< 0,005
10	< 0,05	< 0,02	0,030
11	< 0,05	< 0,02	0,006
MDK	0,20 (u obliku $\text{Fe}^{2+}$ i $\text{Fe}^{3+}$ -jona)	0,10	5,0

Gvožđe već u malim koncentracijama od oko  $0,2 \text{ mg/dm}^3$  izaziva poteškoće u tehnološkom postupku, kao što su: ometanje ošćenja, doprinosi pojačavanju boje prvenca i sladovine prilikom ispiranja, smanjuje punoće ukusa piva i izaziva dobijanje piva sa grubom gorčinom. Pena postaje smeđe obojena, mada se stabilnost pene i njeno prijanja-

nje poboljšavaju. Nedostatak gvožđa prilikom vrenja (ispod  $0,1 \text{ mg/dm}^3$ ) može biti uzrok ograničenja sinteze enzima disanja, a kod preko  $1 \text{ mg/dm}^3$  gvožđa dolazi do pojačane degeneracije kvasca. Gvožđe pospešuje oksidaciju piva, nastajanje zamucenja i pojave prekomernog penušanja piva.

U uzorku 1 (gradska voda) koncentracija gvožđa je u dozvoljenim koncentracijama, dok je u uzorcima tehnološke i demineralizovane vode ispod granice detekcije [20]. U uzorcima kongresne sladovine i ohmeljene sladovine dobijene separacijom 286 sadržaj Fe je nizak, dok je u uzorku ohmeljene sladovine dobijene separacijom 285 malo iznad dozvoljene koncentracije. Daljim tehnološkim tretmanom, sadržaj Fe se smanjuje, pa je u uzorcima mladog piva, kao i gotovog proizvoda ispod granice detekcije metodom AAS.

Cink uglavnom potiče iz slada, mada se veći deo gubi sa izdvajanjem zrna i toplog taloga, a koncentracija cinka zavisi od pH vrednosti sladovine. Cink je potreban kao hranljiva materija za rast kvasca u malim količinama, na primer od  $0,15$  do  $0,2 \text{ mg/dm}^3$ . Cink pospešuje vrenje i ograničava stvaranje  $\text{H}_2\text{S}$ , ali u visokim koncentracijama, može inhibirati dejstvo amilaze i rast kvasca. Takođe, cink može delovati kao katalizator u oksidaciji piva tako što utiče na zamucenje i stabilnost ukusa. Preporučeni opseg koncentracije  $\text{Zn}^{2+}$ -jona u vodi za proizvodnju piva je između  $0,15$  i  $0,5 \text{ mg/dm}^3$ . Maksimalan sadržaj  $\text{Zn}^{2+}$ -jona u vodi korišćenoj za razblaženja u proizvodnji sa visokim ekstraktom, takođe, je  $0,5 \text{ mg/dm}^3$ .

Svi ispitivani uzorci vode imaju sadržaj cinka znatno ispod propisane vrednosti. Pošto cink uglavnom potiče iz slada, najviši sadržaj cinka je u uzorku kongresne sladovine, a ohmeljavanjem, usled odigravanja određenih biohemijskih procesa, sadržaj cinka u uzorcima ohmeljene sladovine (separacija 285 i 286) opada. Očekivano je da sadržaj cinka u gotovom proizvodu bude manji od sadržaja u mladom pivu, međutim, dobijeni rezultati su u suprotnosti što ukazuje na neophodnost da se sadržaj Zn prati tokom proizvodnje piva.

Bakar može delovati kao katalizator oksidacije u veoma niskim koncentracijama, a čak i u koncentracijama ispod  $1 \text{ mg/dm}^3$  dovodi do koloidne nestabilnosti kao i poremećaja ukusa. Bakar u visokim koncentracijama, preko  $10 \text{ mg/dm}^3$ , može inhibirati enzime i biti toksičan za kvasac.

U ispitivanim uzorcima vode sadržaj bakra je bio ispod granice detekcije. U uzorku sladovine, kao i kukuruznog surogata sadržaj bakra je oko  $1 \text{ mg/dm}^3$ . Analizom dobijenih rezultata ispitivanja uočava se da tokom tehnološkog postupka sadržaj bakra opada, tako da je u uzorcima ohmeljene sladovine, mladog piva i gotovog proizvoda ispod granice detekcije.

## 4. ZAKLJUČAK

Od sirovina za proizvodnju piva analizirana je voda (gradska, tehnološka i demineralizovana). Merenja pH vrednosti ukazala su na povećanu vrednost pH u uzorku tehnološke vode, ali to nije imalo uticaj na ukomljavanje slada pošto su ispitivani uzorci sladovine, mladog piva i gotovog proizvoda imali pH vrednost u očekivanom opsegu.

Analiza sadržaja anjona i katjona u ispitivanim uzorcima vode, pokazala je da je koncentracija ispitivanih anjona ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$ ), katjona ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) i mikroelemenata (Fe, Cu i Zn) u granicama propisanim Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće.

Sadržaj  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{NO}_3^-$ -jona u uzorcima sladovine i piva (mladog i gotovog proizvoda) bio je u preporučenim granicama, koncentracija  $\text{Cl}^-$ -jona iznad  $150 \text{ mg/dm}^3$ , dok je promena sadržaja  $\text{PO}_4^{3-}$ -jona bila neznatna.

Metoda AAS, kao standardna metoda za analizu jona metala, uzeta je kao referentna za ispitivanje sadržaja alkalnih i zemnoalkalnih metala u ispitivanim uzorcima. Rezultati dobijeni ovom metodom upoređeni su sa rezultatima dobijenih metodom IC za ispitivanje uzoraka vode pri čemu je primećeno odstupanje u njihovim vrednostima. Međutim, obe metode su ukazale na povećan sadržaj natrijuma u demineralizovanoj vodi, što može biti posledica oslabljenog rada jonskih izmenjivača, koji se koriste u proizvodnji demineralizovane vode.

Sadržaj alkalnih i zemnoalkalnih metala određen metodama IC i AAS u uzorcima sladovine i piva (mladog i gotovog proizvoda) je ukazao da su rezultati dobijeni ovim dvema metodama bili u saglasnosti. Koncentracije K, Na, Ca i Mg u ispitivanim uzorcima sladovine i piva bile su u preporučenom opsegu.

U analiziranim uzorcima vode sadržaj mikroelemenata (Fe, Cu i Zn) bio je u skladu sa Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode. Pošto dati mikroelementi imaju bitnu ulogu u metabolizmu kvasca, smanjenje sadržaja Fe, Cu i Zn od sladovine prema pivu je očekivano. Sadržaj ispitivanih elemenata u uzorcima sladovine i piva (mladog i gotovog proizvoda) bio je u preporučenim granicama.

Odstupanja se javljaju u promeni koncentracije Zn u mladom pivu i gotovom proizvodu. Pošto sadržaj Zn u gotovom proizvodu treba da bude manji nego u mladom pivu, neophodno je sadržaj Zn pratiti u proizvodnji piva.

## Zahvalnica

Ovaj rad je rađen u okviru projekta broj III 43009 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## 5. LITERATURA

- [1] I.Leskošek-Čukalović (2002) Tehnologija piva, knjiga, deo I, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- [2] W.Kunze (1998) Tehnologija pivarstva i sladarstva, Jugoslovensko udruženje pivara, Beograd.
- [3] Available from: <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/senzorne-karakteristike-piva>
- [4] J.Kišgeci (2001) Istorijat hmeljarstva i pivarstva, Galerija nauke i tehnike SANU i Muzej nauke i tehnike, Beograd.
- [5] I.Hornsey (2004) A history of Beer and Brewing, (1<sup>st</sup> ed.), Royal Society of Chemistry, Amazon.
- [6] J.Kišgeci (2007) Svet piva i piva sveta, Aurora, Novi Sad.
- [7] H.M.Eßlinger (2009) Handbook of Brewing, Wiley-VCH, New York.
- [8] L.Narziss, F.Weinfurter, K.Schuster (1988) Tehnologija proizvodnje sladovine (prevod: S. Gaćeša, O. Grujić), Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd.
- [9] C.Proestos, M.Kolaitis (2006) Antioxidant capacity of hops. In: Preedy V.R. (eds.): Beer in Health and Disease Prevention, Academic Press, London UK.
- [10] M.B.Rajković, I.D.Novaković. (2005) Praktikum iz analitičke hemije - klasične metode, Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- [11] J.S.Fritz, D.T.Gjerde (2000) Ion Chromatography, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-VCH, New York.
- [12] M.B.Rajković, M.D.Stojanović, C.M.Lačnjevac, D.V.Tošković, D.D.Stanojević (2008) Određivanje tragova radioaktivnih supstanci u vodi za piće, Zaštita materijala, 49(4), 44-54.
- [13] M.B.Rajković, M.D.Stojanović, C.M.Lačnjevac, D.V.Tošković, D.D.Stanojević (2009) Detekcija i određivanje nekih teških metala u vodi gradske vodovodne mreže naselja Vidikovac-Beograd preko izdvojenog kamenca iz vode, Zaštita materijala, 50(1), 35-44.
- [14] M.B.Rajkovic, M.D.Stojadinović, G.K.Pantelić (2009) Indirektna metoda određivanja elemenata (metala i nemetala) u vodi za piće ispitivanjem kamenca, *monografija*, SITS, Beograd.
- [15] M.B.Rajković, I.Sredović Ignjatović, Lj.Ignjatović, V.Nedović, S.Prijić (2015) Praćenje promene sadržaja jona u uzorcima piva i sirovina za proizvodnju metodom jonske hromatografije (IC), Journal of Agricultural Sciences (in press)
- [16] S.Prijić (2013) Primena klasičnih i instrumentalnih metoda analize za kontrolu kvaliteta piva i sirovina u proizvodnji, *diplomski rad*, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- [17] S.Casaregola (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 1607-1618.

- [18] K.D.Heyse (1989) Handbuch der Breuere-Praxis, Getranke-Fachverlag, Nrnberg.
- [19] I.Leskošek-Čukalović (2000) Fiziološki status piva u svakodnevnoj ishrani. Acta Periodica Technologica, 31, 39-52
- [20] Službeni list SRJ (1992) Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstancija hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama, br. 5/92, 67-85.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF CATIONS AND METALS IN SAMPLES OF BEER AND RAW MATERIALS FOR BEER PRODUCTION BY ION CHROMATOGRAPHY (IC) AND ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY (AAS) METHODS

*In order to control the quality of beer and raw materials for beer production, methods as ion chromatography (IC) and atomic absorption spectrophotometry (AAS) were applied. Water was analyzed as a raw material for beer production (urban, technological and demineralized water). Measurements of pH values indicated the increased pH values in the sample of technological water, but it had no impact on wort hopping, since the tested samples of wort, young beer and final product had a pH value in the expected range. Analyzing the content of anions and cations in the examined water samples, it is shown that the concentration of these examined anions ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  and  $PO_4^{3-}$ ) and cations ( $NH_4^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), as and microelements (Fe, Cu i Zn) are within the limits prescribed by the Regulations on hygienic safety of drinking water and the Regulations of quality and other requirements for beer. Investigating contents of anions in samples of wort and beer (young beer and final product) showed that the contents of  $SO_4^{2-}$  and  $NO_3^-$  ions were within recommended limits and the concentration of  $Cl^-$  ions was above 150 mg/dm<sup>3</sup>, which may have an impact on sensory characteristics of beer, while changes in the content of  $PO_4^{3-}$  ions were insignificant. Since AAS method is a standard method for analyzing content of alkaline and alkaline earth metals, the results obtained by this method in beer samples are taken as a referent results and according to them an analyse was performed and results obtained by IC method were compared. Results of the determination of Na, Ca and Mg in examined water samples have shown variations, but both methods have shown the increased content of Na in demineralized water. The contents of alkaline and alkaline earth metals in wort and beer (young beer and final product) have shown that the results obtained by these two methods were in agreement.*

**Keywords:** beer, ion chromatography, atomic absorption spectrophotometry, heavy metals

Scientific paper

Paper received: 14. 07. 2015.

Paper accepted: 10. 09. 2015.

Paper is available on the website: [www.idk.org.rs/casopis](http://www.idk.org.rs/casopis)