

# Vergleich der Deuterium- und Kohlenstoff-13-Gehalte in Fermentations- und Syntheseethanol

Comparison of the Deuterium and Carbon-13 Contents of Ethanol Obtained by Fermentation and Chemical Synthesis

Peter Rauschenbach und Helmut Simon

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München

Willibald Stichler und Heribert Moser

Institut für Radiohydrometrie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München

Z. Naturforsch. **34 c**, 1–4 (1979) ; eingegangen am 2. November 1978

Deuterium, Carbon-13, Synthetic and Fermentation Ethanol

The ratios of deuterium to hydrogen and carbon-13 to carbon-12 expressed as  $\delta D$  ‰ and  $\delta^{13}C$  ‰, respectively, were determined in ten synthetical ethanols of different origin and compared with those of 28 samples of ethanol which were prepared from plant material grown in different places and at different times. The  $\delta D$  values of the synthetic ethanols are between  $-117$ ‰ and  $-140$ ‰ and those for ethanol obtained by fermentation between  $-200$ ‰ and  $-272$ ‰. Using glucose samples of different origins with  $\delta D$  values between  $-3$ ‰ and  $-76$ ‰ and water of a  $\delta D$  value of  $-77$ ‰ led to ethanol with drastically diminished deuterium contents ranging from  $\delta D$  values of  $-211$  to  $-247$ ‰. The differences of the  $\delta^{13}C$  values between ethanols obtained by fermentation of  $C_3$  and  $C_4$ -plant carbohydrates are greater than those between synthetic ethanols and the ethanols obtained from the starch of  $C_3$ -plants.

Es ist aus einer Reihe von Gründen von Interesse, Gärungsethanol von Syntheseethanol aus Erdöl oder Kohle zu unterscheiden. Bisher wurde dies meist durch die Unterschiede im  $^{14}C$ -Gehalt erreicht [1–7], da  $^{14}C$  bei einer Halbwertszeit von ca. 5700 Jahren in Kohle und Erdöl, die seit vielen Millionen Jahren aus dem natürlichen Kreislauf ausgeschieden sind, nicht mehr vorkommt.  $^{14}C$ -Messungen sind somit ein relativ einfaches Verfahren um Materialien biogenen Ursprungs von Synthesematerialien zu unterscheiden. Dieses Verfahren ist jedoch nicht fälschungssicher. Über Fälschungen berichten Resmini *et al.* [7]. Bei unseren Untersuchungen stießen wir auch auf Proben, die sehr wahrscheinlich gefälscht worden waren, da sie einen wesentlich höheren  $^{14}C$ -Gehalt aufwiesen als bisher für biologisches Material, dessen  $^{14}C$ -Gehalt ausschließlich aus dem  $^{14}C$ -Gehalt des atmosphärischen Kohlendioxids stammt, beobachtet wurde [8]. Es erhob sich die Frage ob Syntheseethanol von Fermentationsethanol durch den Gehalt an Deuterium ( $^2H$  oder D) bzw.  $^{13}C$  unterscheidbar ist. Dabei hängt der D-Gehalt von Fermentationsethanol sowohl vom D-Gehalt des zu fermentierenden Pflanzenmaterials, z. B. Stärke als

auch von dem des Wassers ab, in dem die Fermentation ausgeführt wird. Die Inkorporation von Tritium ( $^3H$  oder T) aus Fermentationswasser in Ethanol bzw. Austausch von Tritium, gebunden an verschiedene Kohlenstoffatome der Glucose, wurde von uns früher in anderem Zusammenhang untersucht [9–11]. Studien mit Hilfe von Deuterium wurden etwas später durchgeführt [12, 13]. Ziegler *et al.* [14] analysierten höhere Pflanzen auf ihren D- und  $^{13}C$ -Gehalt, wobei der D-Gehalt auch in Abhängigkeit vom Gießwasser untersucht wurde. Das heutige Syntheseethanol dürfte weitgehend aus Ethen durch Hydratisierung hergestellt werden [15]. Über den D- und  $^{13}C$ -Gehalt von Ethen scheint bisher nicht berichtet worden zu sein. Über einige D- und  $^{13}C$ -Gehalte in Ethanolen, die aus Substraten mit bekannten D- und  $^{13}C$ -Gehalten durch Fermentation mit Wasser von bekanntem D-Gehalt gewonnen worden waren, berichten Bricout *et al.* [16–18].

## Experimentelles

a) Fermentation. Ein Teil der massenspektrometrisch untersuchten Ethanolproben wurde aus Stärke nach deren Hydrolyse durch Vergärung gewonnen. In einem typischen Ansatz wurde Stärke entsprechend 2 mol Glucose in 3 l Standard-Wasser mit 0,20 ml Thermamyl bei 90 °C während 2 h ver-

Sonderdruckanforderungen an Prof. H. Simon, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität München, Lichtenbergstraße 4, 8046 Garching.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

flüssigt und mit 0,60 ml SAN bei 55 °C innerhalb von 15 min vollständig hydrolysiert. (Thermamyl und SAN, Novo Industrie GmbH, D-65 Mainz, Kantstr. 2.) Mit 30 g Bäckerhefe, 5,0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  und 5,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden in einem New-Brunswick-Schüttler bei 33 °C 90 h fermentiert und das Ethanol destillativ auf eine Stärke von ca. 90 Gew.-% angereichert.

b) Dehydratisierung. Alle Ethanolproben unter 99 Gew.-% wurden mit einem geringen Überschuß an Calciumhydrid getrocknet, wobei nach Abklingen der ersten heftigen Reaktion der Umsatz bei ca. 60 °C in 90 min vervollständigt und durch Lyophilisation separiert wurde.

Die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure erfolgte nach Kuhn-Roth [19]. Acetat wurde als Ca-Salz isoliert.

c) Präparation für die massenspektrometrische Messung. Die Proben wurden in einer geschlossenen Apparatur, wie von Schiegl und Vogel [20] angegeben, verbrannt. Bei der Verbrennung der Stärke- und Mehlsproben wurde  $\text{O}_2$ -Gas verwendet; bei den Ethanolproben erfolgte die Oxidation im Kupferoxidofen (700 °C), unter Zirkulation in einem  $\text{N}_2$ -Gasstrom. Die Verbrennungsprodukte Kohlendioxid und Wasser wurden durch Kühlfallen getrennt.

d) Massenspektrometrische Isotopenverhältnismessungen. Die Bestimmung des  $^{13}\text{C}$ -Gehalts erfolgte am Kohlendioxidgas. Die D-Gehalte wurden an Wasserstoffgas gemessen, das durch quantitative Reduktion aus den Wasserproben gewonnen worden war [20]. Massenspektrometer: Varian MAT 230 bzw. M 86 mit Doppeleinlaßsystem und Doppelaufnehmer.

## Ergebnisse und Diskussion

Es wurden 10 synthetische Ethanole verschiedener Herkunft analysiert (Tab. I). Ihr D-Gehalt liegt zwischen  $\delta D = -117$  und  $-140\text{‰}$ . Diese Werte sind zu erwarten. Nach Schiegl und Vogel [20] bewegen sich die  $\delta D$ -Werte für Kohle zwischen  $-90$  bis  $-150\text{‰}$ , die für Erdöl zwischen  $-75$  bis  $-100\text{‰}$  und Erdgasproben erreichen nur in seltenen Fällen D-Gehalte von weniger als  $-200\text{‰}$ . Da die Hydratisierung von Ethen bei hohen Temperaturen erfolgt, wodurch der Isotopeneffekt klein ist und Wasser in der Regel einen  $\delta D$ -Gehalt hat der  $-100\text{‰}$  überschreitet, dürfte es kaum Synthese-

Tab. I. D- und  $^{13}\text{C}$ -Gehalte synthetischer Ethanole

Proben-Nr.	Lieferant bzw. Herkunft	Jahr der Herstellung	$-\delta D$ (‰) <sup>a</sup>	$-\delta^{13}\text{C}$ (‰) <sup>b</sup>
1	Erdölchemie GmbH Dormagen	1965	137	26,8
2	Hibernia-Chemie GmbH Herne	1965	130	25,0
3	fossil aufgrund d. $^{14}\text{C}$ -Wertes, Herkunft nicht näher bekannt	1964	130	26,5
4	fossil aufgrund d. $^{14}\text{C}$ -Wertes, Herkunft nicht näher bekannt	1965	134	26,9
5	fossil aufgrund d. $^{14}\text{C}$ -Wertes, Herkunft nicht näher bekannt	1974	133	27,2
6	Erdölchemie GmbH Dormagen	1976	117	27,3
7	Veba	1976	124	28,8
8	Frankreich	1976	123	25,4
9	Commercial Alcohols Ltd. Toronto/Kanada	1976	131	27,8
10	Publicker Industries Inc. Philadelphia/USA	1976	140	32,0

$$\text{a } \delta D = \frac{(D/H) \text{ Probe} - (D/H) \text{ Standard}}{(D/H) \text{ Standard}} \cdot 1000\text{‰};$$

Standard: SMOW (155,76 ppm D/H)

$$\text{b } \delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) \text{ Probe} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) \text{ Standard}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) \text{ Standard}} \cdot 1000\text{‰};$$

Standard: PDB (11237 ppm  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ).

ethanol geben, dessen D-Gehalt geringer als  $\delta D = -200\text{‰}$  beträgt.

Von Bricout *et al.* [18] werden  $\delta D$ -Werte von  $-132$  und  $-140\text{‰}$  berichtet. Die von uns gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Werte bewegen sich für die Syntheseethanole von  $\delta^{13}\text{C} = -25,0$  bis  $-32,0$ .

Die untersuchten Fermentationsethanole (Tab. II) lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Die Proben 1–23 sind Ethanole aus Kartoffeln von verschiedenen Anbauorten und Erntejahren. Die D-Gehalte bewegen sich zwischen  $\delta D = -228$  und  $-272\text{‰}$ , die  $^{13}\text{C}$ -Gehalte zwischen  $\delta^{13}\text{C} = -25,2$  und  $-27,7\text{‰}$ . Drei Ethanole (Nr. 24–26) aus Wein zeigen  $\delta D$ -Werte zwischen  $-200$  und  $-208\text{‰}$ , sowie  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen  $-24,9$  und  $-26,5\text{‰}$ .

Ein Vergleich mit Tab. I zeigt, daß sich aufgrund der  $^{13}\text{C}$ -Gehalte keine sichere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Synthese- und Fermentationsethanol, soweit letzteres nicht aus typischen  $\text{C}_4$ -Pflanzen stammt, ergibt. Die Unterschiede im D-Gehalt er-

Tab. II. D- und  $^{13}\text{C}$ -Gehalte biogener Ethanole.

Proben-Nr.	Herkunft	Wachstums-jahr	$-\delta\text{D}$ (‰)	$-\delta^{13}\text{C}$ (‰)
1	Kartoffel	1967	253	26,4
2	Kartoffel	1967	250	25,2
	D-8371 Sommerberg			
3	Kartoffel/Bayern	1968	272	26,5
4	Kartoffel	1969	261	26,6
5	Kartoffel/Bayern	1970	248	26,0
6	Kartoffel/Bayern	1971	246	25,9
7	Kartoffel/Bayern	1972	251	26,1
8	Kartoffel/Bayern	1973	247	26,9
9	Kartoffel/Bayern	1974	246	27,8
10	Kartoffel	1975	221	25,9
11	Kartoffel	1975	236	27,4
	D-8069 Pörsbach			
12	Kartoffel	1975	240	25,3
	D-7092 Röhlingen			
13	Kartoffel	1975	236	26,9
	D-2841 St. Hülfe			
14	Kartoffel	1975	228	26,6
	D-6753 Enkenbach			
15	Kartoffel	1975	245	27,7
	D-8399 Gründobl			
16	Kartoffel	1975	230	26,1
	D-2861 Hellingst			
17	Kartoffel/D-2919 Gut Carolinenhof	1975	246	27,6
18	Kartoffel	1975	255	25,7
	D-8671 Zedtwitz			
19	Kartoffel	1975	244	26,4
	D-3581 Gilsa			
20	Kartoffel	1975	225	25,3
	D-5444 Polch			
21	Kartoffel/Bayern	1976	247	25,5
22	Weizen		233	23,9
23	Kartoffel/Bayern	1976	241	26,3
24	Wein/Ungarn	1973	208	24,9
25	Wein/Ungarn	1975	202	26,5
26	Wein/Rumänien	1975	200	26,5
27	Mais/USA	1975	230	10,3
28	Mais/Italien	1976	211	10,8

möglichen dagegen in jedem Fall eine Unterscheidung zwischen Synthese- und Fermentationsethanolen.

Zur Klärung der Frage, wieweit die D-Gehalte in den Ausgangskohlenhydraten den D-Gehalt des Ethanols beeinflussen, wurden verschiedene Stärken bzw. ein Weizenmehl auf ihren D-Gehalt analysiert und alle im gleichen Wasser mit einem  $\delta\text{D}$ -Wert von  $-77\text{‰}$  mit Hefe fermentiert. Die Ergebnisse sind in Tab. III wiedergegeben. Die D-Gehalte der Ethanole sind in jedem Falle beträchtlich geringer als die der Kohlenhydrate und des Wassers. Damit ist der D-Gehalt in erster Linie durch den Fermentationsprozeß bestimmt und nicht durch die D-Gehalte des Wassers und des Ausgangsmaterials, soweit sich diese in den Schwankungsbreiten bewegen, die in

der Natur beobachtet werden. Dies zeigt auch ein Wert von Bricout *et al.* [18]. Dabei wurde Wasser mit  $\delta\text{D} = -7\text{‰}$  verwendet, um Invertzucker von  $\delta\text{D} = -40\text{‰}$  zu fermentieren. Das Resultat war Ethanol mit  $\delta\text{D} = -210\text{‰}$ .

Unterschiede im D-Gehalt des Ausgangsmaterials sind im Ethanol stark verkleinert. Die Maisstärke aus USA und die Kartoffelstärke aus Bayern zeigen einen Unterschied im  $\delta\text{D}$ -Wert von  $73\text{‰}$ . Der Unterschied im Produkt beträgt dagegen nur noch  $17\text{‰}$ .

Wird das Ethanol zu Essigsäure oxidiert und diese in Form eines Salzes analysiert, so zeigt die Methylgruppe in allen vier Fällen einen geringeren D-Gehalt als das Ausgangsethanol.

Der Unterschied im D-Gehalt ist bei Ethanol aus Kartoffelstärke und Weizenmehl mit etwa  $50\text{‰}$  gleich groß und wesentlich höher als bei den Ethanolen aus Maisstärke. Dies hat vermutlich seinen Grund in unterschiedlichen D-Verteilungen in der Glucose aus Mais- im Vergleich zu der aus Kartoffel- bzw. Weizenstärke.

Die starke Abreicherung des Deuteriums in Ethanol im Vergleich zum Wasser und auch zum Ausgangsmaterial war aufgrund unserer Versuche in T-markiertem Wasser zu erwarten [9–11]. Alle ursprünglichen C-H-Bindungen der Glucose tauschen bei der Glykolyse in einem gewissen Umfang mit den Protonen des Wassers aus. Nach unseren früheren Befunden enthält das Ethanol nach Fermentation von [1-T] bzw. [6-T]-Glucose nur noch ca.  $70\%$  des in der Glucose gebundenen Tritiums. Nach Fermentation von [2-T] oder [3-T]-Glucose sind die entsprechenden Werte  $20\%$  und  $<28\%$ . Bei der Incorporation von Wasserstoffisotopen aus dem Wasser in stabile C-H-Bindungen ist zu beachten, daß der Protonenübergang von HOD- bzw.  $\text{H}_2\text{DO}^+$ -Molekülen im Vergleich zum Deuteronenübergang, bedingt durch Isotopeneffekte, wesentlich bevorzugt ist. Nach früheren Messungen [9] liegt der Produkt-Isotopeneffekt für eine Reihe von Protonentransfer-Reaktionen bei der Glykolyse in Tritium-markiertem Wasser zwischen  $2,5$ – $6,4$ . D. h. es werden nur zwischen  $40$  und  $16\%$  des Tritiums incorporiert, das ohne Isotopeneffekt zu erwarten wäre. Damit ist die Deuteriumabreicherung im Ethanol, im Vergleich zur Ausgangsglucose und Fermentationswasser verständlich.

Der Unterschied im D-Gehalt zwischen Gesamt-Ethanol und Methylgruppe im synthetischen

Tab. III. Vergleich der D- und  $^{13}\text{C}$ -Gehalte verschiedener Stärken bzw. Weizenmehl und der daraus gewonnenen Ethanole sowie der Deuteriumgehalt der Methylgruppe dieser Ethanole und von zwei synthetischen Ethanolen. Die Proben 21, 22, 27 und 28 sind identisch mit den in Tab. II aufgeführten Proben gleicher Nummer und die Proben 6 und 10 mit denen in Tab. I.

Proben-Nr.	Ausgangsmaterial	— $\delta$ D (‰)		Gesamt-Ethanol		CH <sub>3</sub> -Gruppe des Ethanols — $\delta$ D (‰)
		— $\delta$ D (‰)	— $\delta$ $^{13}\text{C}$ (‰)	— $\delta$ D (‰)	— $\delta$ $^{13}\text{C}$ (‰)	
21	Kartoffelstärke Bayern, 1976	76	23,8	247	25,5	297
22	Weizenmehl	44	23,6	233	23,9	282
27	Maisstärke USA, 1975	3	10,0	230	10,3	235
28	Maisstärke Italien, 1976	8	10,5	211	10,8	230
6	vermutlich Ethen	—	—	117	23,3	142
10	vermutlich Ethen	—	—	140	32,0	166

Ethanol liegt mit 25 bzw. 26 Einheiten zwischen dem Unterschied, der bei Ethanol aus Mais- bzw. Kartoffel- oder Weizenstärke beobachtet wird. Ob dies verallgemeinert werden kann ist fraglich, da wir den D-Gehalt der Hydroxylgruppe in den synthetischen Ethanolen nicht bestimmt haben. Die Differenz des D-Gehalts der Methyl- und Hydroxymethylgruppe dürfte jedoch zur Unterscheidung von Synthese- und Fermentationsethanol ohne Bedeutung sein, da der Wert offensichtlich stark davon abhängt, ob Ethanol aus C<sub>3</sub>- oder C<sub>4</sub>-Pflanzen gewonnen wird.

Die zahlreichen Messungen von Fermentationsethanolen aus pflanzlichem Material, das sowohl an

sehr verschiedenen Orten wie zu sehr verschiedenen Zeiten gewachsen ist, zeigen, daß es in den meisten oder in gar allen Fällen möglich sein dürfte, aufgrund des D-Gehalts, Fermentationsethanol von Syntheseethanol zu unterscheiden. Eine Fälschung dürfte kaum möglich sein. Dazu müßte Syntheseethanol an Deuterium angereichert werden.

Herrn F. Wendling danken wir für geschickte Mithilfe, für kostenlose Überlassung von definierten Stärkeprodukten der Firmen Sünchinger Stärke GmbH, Sünching, und Maizena Industrieprodukte GmbH, Hamburg, sowie für einige definierte synthetische und biogene Ethanole der Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach.

- [1] A. Walton, M. S. Baxter, W. J. Callow u. M. J. Baker, Proc. Symp. Radioactive Dating and Methods of Low Level Counting, Monaco, March 1967.
- [2] H. Simon, P. Rauschenbach u. A. Frey, Z. Lebensm. Forsch. **136**, 279 (1968).
- [3] P. Rauschenbach u. H. Simon, Z. Lebensm. Forsch. **157**, 143 (1975).
- [4] R. L'Orange u. K. E. Zimen, Naturwissenschaften **55**, 35 (1968).
- [5] V. Astegiano, Atti dell'Acc. It. della Vite e del Vino, Siena, **23**, 45 (1971).
- [6] P. Resmini u. G. Volonterio, Riv. Vitic. Enol. **10**, 3 (1974).
- [7] P. Resmini, G. Volonterio u. L. Cecchi, Riv. Vitic. Enol. **29**, 324 (1976).
- [8] P. Rauschenbach u. H. Simon, unveröffentlicht.
- [9] H. Simon, R. Medina u. G. Müllhofer, Z. Naturforsch. **23 b**, 59 (1968).
- [10] K. Schmidt, G. Müllhofer u. H. Simon, Z. Naturforsch. **23 b**, 64 (1968).
- [11] H. Simon u. R. Medina, Z. Naturforsch. **23 b**, 326 (1968).
- [12] W. K. Saur, H. L. Crespi, E. A. Halevi u. J. J. Katz, Biochemistry **7**, 3529 (1968).
- [13] W. K. Saur, D. T. Peterson, E. A. Halevi, H. L. Crespi u. J. J. Katz, Biochemistry **7**, 3537 (1968).
- [14] H. Ziegler, C. B. Osmond, W. Stiehler u. P. Trimborn, Planta **128**, 85 (1976).
- [15] W. Horak, Ullmanns Encyklopädie d. techn. Chemie, Äthanol und Spirituosen, Verl. Chemie, Weinheim, 1974.
- [16] J. Bricout, J.-Ch. Fontes, R. Letolle, A. Mariotti u. L. Merlivat, Isotope ratios as pollutant source and behaviour indicators, International Atomic Energy Agency, p. 359, Vienna 1975.
- [17] J. Bricout, J.-Ch. Fontes, L. Merlivat u. M. Pusset, Industries Alimentaires et Agricoles, **92**, 375 (1975).
- [18] J. Bricout u. Y. Ménoret, Ann. Technol. Agric., **24**, 247 (1975).
- [19] H. Simon u. H. G. Floss, Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- [20] W. E. Schiegl u. J. C. Vogel, Earth and Planet. Science Letters **7**, 307 (1970).