

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 154/2010

(22) Anmeldetag: 04.02.2010

(45) Veröffentlicht am: 15.03.2011

(51) Int. Cl. : **C12P 7/42** (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
WO 2009/040095A2 AT 398982B
DE 102006052311A1

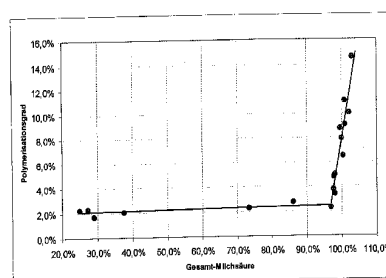
(73) Patentinhaber:
JUNGBUNZLAUER AUSTRIA AG
A-1010 WIEN (AT)

(72) Erfinder:
EDLAUER ROBERT ING.
LAA A.D. THAYA (AT)
REINWEIN FLORIAN ING.
GÖLLERSDORF (AT)
TRIMMEL STEFAN DIPL.ING.
LAA A.D. THAYA (AT)
GASS JOSEF DR.
DRÖSING (AT)

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON HYDROXYCARBONSÄUREN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Hydroxycarbonsäuren durch Fermentation von die gewünschte(n) Hydroxycarbonsäure(n) produzierenden Mikroorganismen und anschließende mehrstufige Reinigung der Fermentationslösung mit dem Kennzeichen, dass die mehrstufige Reinigung die folgenden Verfahrensschritte, in der angegebenen Reihenfolge, umfasst:

- chromatographische Reinigung der Lösung zur Abtrennung von Kohlenhydraten und anderen nichtionischen Komponenten;
- ein- oder mehrstufige Eindampfung zum Erhalt von weitgehend oder im Wesentlichen vollständig entwässerter Hydroxycarbonsäure;
- Vakuumdestillation der so erhaltenen Hydroxycarbonsäure; und
- Rezyklierung des Destillationsrückstands.



Figur 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Hydroxycarbonsäuren durch Fermentation und Reinigung der gewünschten Säuren aus der Fermentationslösung.

[0002] Die biotechnologische Produktion von Hydroxycarbonsäuren durch Fermentation von Kohlenhydraten ist seit langem bekannt. Eines der Hauptprobleme bei der Reinigung dieser Säuren blieb jedoch bestehen, nämlich die Gefahr der Oligomerisierung oder Polymerisation der Säure durch Polykondensation unter Wasserabspaltung, die vor allem durch ionische Verunreinigungen katalysiert wird. Das Problem tritt speziell im Falle der Milchsäure auf, da deren Reinigung häufig einen oder mehrere Destillationsschritte unter mehr oder weniger starkem Erhitzen - je nach Güte des dabei angelegten Vakuums - umfasst. Gleichzeitig wird heutzutage jedoch eine besonders hohe Reinheit der so erhaltenen Milchsäure gefordert, da ihr Verwendungszweck häufig die anschließende, gezielte Polymerisation zu möglichst langkettigen Milchsäure-Homo- und -Copolymeren (z.B. mit Glykolsäure) ist. Ein weiteres Problem sind während der Reinigung auftretende Verfärbungen der Milchsäure, die mitunter ebenfalls auf die Gegenwart ionischer Verunreinigungen zurückgeführt wird.

[0003] Die prinzipielle Möglichkeit, Milchsäure destillativ zu reinigen, ist seit vielen Jahrzehnten bekannt, siehe z.B. US 1594843 (J.W. Lawrie; eingereicht am 19. August 1921). Damals wurde jedoch mit vergleichsweise stark verdünnten Ausgangslösungen (20-40 %) bei hohen Temperaturen über 200°C und schlechtem Vakuum (86 mbar) gearbeitet. Allerdings wurde bereits damals erkannt, dass die Destillation aus einem Dünnschicht vorteilhafte Ergebnisse liefert, da so ein rascher Übertritt in die Gasphase erfolgt, was die Verweilzeit bei höheren Temperaturen verkürzt.

[0004] Eine Verbesserung des Verfahrens wurde von Borsook, Huffman und Liu, "The Preparation of crystalline Lactic Acid", Pasadena, 1933, erzielt, die vor der Reindestillation eine zweistufige destillative Eindampfung, nämlich eine Grobentwässerung im Wasserstrahlvakuum und eine Destillation mittels Ölvakuumpumpe bei ca. 0,1 mmHg vorsahen. Die anschließende Reindestillation erfolgte in demselben Feinvakuum. Zudem wird in dieser Arbeit empfohlen, anstelle eines großen Ansatzes mehrere kleinere Chargen zu destillieren sowie die Destillationswege kurz zu halten, um so wiederum die Verweilzeiten der Milchsäure bei höheren Temperaturen zu verkürzen. Auch der durch die Eindampfung angestrebte, möglichst geringe Wassergehalt ist eine physikalische Notwendigkeit, um in nachfolgenden Destillationsschritten möglichst niedrige Drücke und dementsprechend niedrige Siedetemperaturen erzielen zu können.

[0005] In der Folge wurden verschiedene Verfahren unter Einsatz von (auch als Molekulardestillation bezeichneter) Kurzwegdestillation der Milchsäure entwickelt. Als Beispiel sei die US 5766439 (Eyal et al., eingereicht am 20. November 1996) genannt.

[0006] Auch eine chromatographische Reinigung von Milchsäure wurde beschrieben, z.B. in der EP 377430 (veröffentlicht am 11. Juli 1990) der Anmelderin des vorliegenden Erfindungsgegenstandes oder auch in US 5068418 (veröffentlicht am 26. November 1991), worin Milchsäure bei einem pH-Wert unterhalb des pKa von Milchsäure an ein schwach basisches Anionenaustausch-Harz adsorbiert und mit Wasser oder verdünnter anorganischer Säure, wie z.B. Schwefelsäure, wieder davon desorbiert wird.

[0007] Ebenso wurde bereits beschrieben, eine Milchsäure enthaltende Lösung Ionenaustausch zu unterziehen, um störende ionische Verunreinigungen zu entfernen. Siehe z.B. die obige US 5766439, GB 907321 A (veröffentlicht am 3. Oktober 1962), JP 63141597 A (veröffentlicht am 14. Juni 1988), JP 4271787 A (veröffentlicht am 28. September 1992) und EP 517242 A2 (veröffentlicht am 9. Dezember 1992).

[0008] Brussels Biotech, die bereits in der im Januar 1996 veröffentlichten BE 1008099 A3 (vgl. das dortige Beispiel 1) eine zweistufige destillative Eindampfung von Milchsäure durch Entwässerung mittels Kurzwegdestillation beschrieben hatten, offenbart in der WO 98/55442 mit Priori-

tät vom 6. Juni 1997 ein Verfahren zur Reinigung von wässrigen Milchsäurelösungen, z.B. solchen aus Fermentationsprozessen, das eine Vorbehandlung zur Entfernung ionischer Substanzen, welche die Polykondensation der Milchsäure katalysieren könnten, gefolgt von einem Eindampfungs- und einem Destillationsschritt, die vorzugsweise beide Kurzwegdestillationen sind.

[0009] In der US 7410556 B1 der Purac Biochem B.V. wird schließlich eine mehrstufige Kolonnen-Destillation einer Lösung einer organischen Säure, vorzugsweise Milchsäure, offenbart, die einen Siedepunkt von unter 450°C bei Atmosphärendruck, einen Gehalt an Carboxylat-Ionen von maximal 275 g/l und vorzugsweise einen Gehalt an ionischen Verunreinigungen von weniger als 1 Gew.-%, noch bevorzugter weniger als 0,01 Gew.-%, aufweist. In der ersten Destillationsstufe kommt Dünnschichtverdampfung zum Einsatz, in der zweiten mitunter Kurzwegdestillation, wiewohl beide Stufen jeweils auch mehrere Trennkolonnen umfassen können. Destillationsrückstände aus der zweiten Stufe werden gegebenenfalls hydrolysiert und rezykliert.

[0010] Die Lehre des Standes der Technik lautet demnach übereinstimmend, dass trotz des Einsatzes von Dünnschichtverdampfung und/oder Kurzwegdestillation zur Reinigung von Hydroxycarbonsäuren wie etwa Milchsäure eine vorhergehende Entfernung ionischer Verunreinigungen vonnöten ist, um die Bildung von Kondensationsprodukten während der Destillation zu unterdrücken. Zu diesem Zweck ist eine aufwändige Vorbehandlung vonnöten, vor allem bei Reinigung der Säure aus Fermentationslösungen und insbesondere bei Verwendung sehr unreiner Nährstoff- und Kohlenstoffquellen für den jeweiligen Mikroorganismus.

[0011] Ziel der Erfindung war es daher, ein einfacheres, rascheres und wirtschaftlicheres Verfahren zur Produktion solcher Säuren durch Fermentation in zumindest gleicher oder sogar höherer Reinheit zu entwickeln.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0012] Dieses Ziel wird gemäß vorliegender Erfindung durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Hydroxycarbonsäuren durch Fermentation von die gewünschten) Hydroxycarbonsäure(n) produzierenden Mikroorganismen und anschließende mehrstufige Reinigung der Fermentationslösung erreicht, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die mehrstufige Reinigung die folgenden Verfahrensschritte, in der angegebenen Reihenfolge, umfasst:

[0013] a) chromatographische Reinigung der Lösung zur Abtrennung von Kohlenhydraten und anderen nichtionischen Komponenten;

[0014] b) ein- oder mehrstufige Eindampfung zum Erhalt einer weitgehend oder im Wesentlichen vollständig entwässerten Hydroxycarbonsäure;

[0015] c) Vakuumdestillation der so erhaltenen Hydroxycarbonsäure; und

[0016] d) Rezyklierung des Destillationsrückstands.

[0017] Dieses Verfahren beruht auf der Entdeckung der Erfinder, dass ionische Verunreinigungen die Destillation in weitaus geringerem Ausmaß stören, als bisher angenommen wurde. Hauptverantwortlich für die schlechte Ausbeuten bzw. geringe Reinheitsgrade des Produkts sind vielmehr nichtfermentierte Kohlenhydrate und andere nichtionische Komponenten, wie z.B. als Kohlenstoffquelle dienende Polysaccharide sowie Proteine und ähnliche Bestandteile der Nährmittel. Ohne sich auf eine bestimmte Theorie festlegen zu wollen, wird angenommen, dass diese Verbindungen ansonsten einerseits - vor allem aufgrund von Zersetzung und diverser unerwünschter Reaktionen der Zersetzungsprodukte - zu einer Verfärbung der gewünschten Säure führen und andererseits als Ausgangspunkte ionisch katalysierter Polymerisation fungieren können. Werden daher solche Verbindungen vor der Durchführung von Destillationsschritten, d.h. vor dem Erhitzen der Lösung der Hydroxycarbonsäure abgetrennt, wird nach der Vakuumdestillation eine weitaus reinere Fraktion der Milchsäure erhalten, wie in den späteren Ausführungsbeispielen belegt wird. Und das entgegen der herrschenden Lehre, d.h. ohne diese ionischen Verunreinigungen entfernen zu müssen.

[0018] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbaren Säuren sind prinzipiell alle durch Fermentation zugänglichen und ohne nennenswerte Zersetzung destillierbaren Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. Milchsäure, deren Stellungsisomer 3-Hydroxy-propionsäure und die Hydroxybuttersäure-Isomere, sowie Gemische davon, falls der Mikroorganismus zur gleichzeitigen Produktion mehrerer Säuren in der Lage ist. Aufgrund ihrer hohen wirtschaftlichen Bedeutung liegt jedoch das Hauptaugenmerk der vorliegenden Erfindung auf Milchsäure.

[0019] Auch die Betriebsweise des Verfahrens ist nicht speziell eingeschränkt, so dass kontinuierlicher, semikontinuierlicher und auch Chargenbetrieb von der Erfindung umfasst sind. Zur Erhöhung des Durchsatzes und Verkürzung der Verweilzeiten zwischen den einzelnen Verfahrensschritten wird jedoch ein kontinuierlicher oder semikontinuierlicher Betrieb bevorzugt.

[0020] Die Art der chromatographischen Reinigung in Schritt a) ist nicht speziell eingeschränkt, solange die Zielkomponenten, also Kohlenhydrate und nichtionische Komponenten, abtrennbar sind. Dementsprechend sind neben Gelpermeations- und Adsorptionschromatographie beispielsweise auch Ausführungsformen wie Verteilungschromatographie oder Affinitätschromatographie, aber auch druckunterstützte Verfahren wie HPLC umfasst. Erfindungsgemäß bevorzugt ist aufgrund des hohen Durchsatzes und des geringen apparativen Aufwands die Adsorptionschromatographie, gegebenenfalls unter Druckbeaufschlagung, vorzugsweise unter Anwendung eines SMB-Verfahrens ("simulated moving bed"; simuliertes Fließbett).

[0021] Die Entwässerung bzw. Eindampfung in Schritt b) des Verfahrens kann ein- oder mehrstufig durchgeführt werden, solange gewährleistet ist, dass danach ein auf den gewünschten Wassergehalt verringerter Feed mit ausreichender Reinheit für den Destillationsschritt c) erhalten wird. Vorzugsweise wird daher ein nach dem Stand der Technik bekanntes mehrstufiges Verfahren durchgeführt, z.B. bestehend aus einer so genannten Entgasung zur Entfernung des größten Teils des Wassers und einem nachfolgenden Eindampfschritt. Vorzugsweise wird dabei das Wasser praktisch zur Gänze entfernt, wiewohl dies auch Nachteile mit sich bringt, wie dies in den späteren Beispielen näher ausgeführt wird. Bei geeigneter Verfahrensführung, z.B. bei Wahl eines entsprechenden Schnittverhältnisses bei der Destillation in Schritt c), braucht - entgegen der herrschenden Lehre - nicht das gesamte Wasser entfernt zu werden. Zur Verringerung der thermischen Belastung der gewünschten Hydroxycarbonsäure wird vorzugsweise in zumindest einer Eindampfstufe in Schritt b) Kurzwegdestillation oder Dünnschichtdestillation, insbesondere Kurzwegdestillation, durchgeführt. Dasselbe gilt auch für die Vakuumdestillation in Schritt c).

[0022] Eine wesentliche weitere Erkenntnis der Erfinder liegt in der Steuerung des zeitlichen Verfahrensablaufs. Es wurde nämlich herausgefunden, dass die unerwünschten Nebenreaktionen während der Reinigung von Hydroxycarbonsäuren auch dadurch weit gehend unterdrückt werden können, indem die Verweilzeiten nicht nur in den jeweiligen Verfahrensstufen, sondern auch dazwischen, insbesondere zwischen der Eindampfung in Schritt b) und der anschließenden Vakuumdestillation in Schritt c), kurz gehalten werden. Folglich wird in bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens Schritt c) nicht mehr als etwa 1 h nach Schritt b) durchgeführt, noch bevorzugter nicht mehr als etwa 30 min nach Schritt b). Besonders bevorzugt ist hier eine möglichst kontinuierliche Überleitung des Feeds von Schritt b) zu Schritt c), d.h. eine Verzögerung von nur wenigen Minuten, wie z.B. 1 oder 2 min.

[0023] In Schritt d) des Verfahrens werden Destillationsrückstände der Destillation aus Schritt c) rezykliert und erneut vorhergehenden Verfahrensschritten ab dem Chromatographieschritt a), zumindest aber ab dem Eindampfschritt b) unterzogen. Auf diese Weise werden störende Auswirkungen von Nebenreaktionen während des Reinigungsvorgangs weiter verringert, da z.B. etwaige Polymerisate bzw. Kondensate der gewünschten Säure hydrolysiert und zu früheren Verfahrensstufen rückgeführt werden können, ohne dass die darin enthaltene Menge an Hydroxycarbonsäure aus dem Verfahren verloren geht. Aus diesem Grund kann die abschließende Vakuumdestillation auch mit einem relativ niedrigen Schnittverhältnis, d.h. das Verhältnis zwischen Destillat und Feed, betrieben werden. Dies steht erneut im Gegensatz zu Verfahren nach dem Stand der Technik, wo im abschließenden Destillationsschritt regelmäßig ein möglichst

hoher Prozentsatz der Säure (z.B. 90 % oder mehr) aus dem Feed abdestilliert werden soll. Durch die Wahl eines niedrigeren Schnittverhältnisses, z.B. von nur etwa 80 %, wird im erfindungsgemäßen Verfahren hingegen in verhältnismäßig kurzer Zeit und somit unter geringer thermischer Belastung der Säure ein hochreines Produkt erhalten, während der Rest, gegebenenfalls nach Hydrolyse wie oben erwähnt, recycelt wird.

[0024] Obwohl im Verfahren der Erfindung keine Entfernung von Polymerisation oder Verfärbung bewirkenden ionischen Verunreinigungen erforderlich ist, kann in manchen Ausführungsformen vor einem der Schritte a) bis c) dennoch ein optionaler zusätzlicher Schritt zur Entfernung ionischer Komponenten, wie z.B. Ionenaustausch, durchgeführt werden, um insbesondere korrosive Anionen wie Chlorid oder Sulfat zu entfernen und so die Lebensdauer der Anlage zu erhöhen.

[0025] Im erfindungsgemäßen Verfahren wird bei der Fermentation aus Gründen der Verfügbarkeit und Wirtschaftlichkeit vorzugsweise eine auf Mais basierende Kohlenstoffquelle eingesetzt, wobei aufgrund der erfindungsgemäßen Verfahrensführung durchaus kostengünstiger, wenn auch üblicherweise relativ unreiner, Maisschrot eingesetzt werden kann. Als weiterer, stickstoffhaltiger Nährstoff wird bei der Fermentation vorzugsweise Soja-, Raps- oder Sonnenblumenprotein oder ein Gemisch davon, gegebenenfalls nach vorheriger Behandlung mit proteolytischen Enzymen, eingesetzt.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNG

[0026] Fig. 1 zeigt eine grafische Darstellung der Messergebnisse aus Beispiel 2.

[0027] Die Erfindung wird nachstehend anhand von nichteinschränkenden Beispielen näher beschrieben.

BEISPIELE

[0028] In allen späteren Beispielen und Vergleichsbeispielen wurde die folgende allgemeine Vorgangsweise für die Fermentation, Grobreinigung, Chromatographie und Destillation angewandt. Prozent- und ppm-Angaben sind, sofern nichts Gegenteiliges angegeben ist oder aus dem Zusammenhang hervorgeht, auf das Gewicht bezogen. Die Druckangaben sind absolute Drücke.

[0029] Ganze Maiskörner wurden mit einer Mühle auf eine Endfeinheit < 2 mm geschrotet und mit Wasser in einer Konzentration von etwa 18 % suspendiert. Diese Suspension wurde auf bekannte Weise mit Amylase und Glucoamylase verflüssigt und verzuckert. Zu dieser sehr unreinen Glucoselösung wurde 1 % Rapsextraktionsschrot zugesetzt, und der pH-Wert wurde mit wässriger Ammoniaklösung auf 8,5 eingestellt. Bei 60°C wurden die in Raps und Mais enthaltenen Proteine mit einer alkalischen Protease während 6 Stunden hydrolysiert. Anschließend wurde die Suspension auf 50°C abgekühlt und mit einer Vorkultur von *Bacillus coagulans* beimpft. Als Nährsalze wurden noch 0,1 % KH_2PO_4 , 50 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 ppm $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 3 ppm $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt, und der pH-Wert wurde durch Zugabe von 24 %iger wässriger Ammoniaklösung auf 6,5 gehalten. Nach 20 bis 30 Stunden anaerober Fermentation war die freie Glucose zu optisch reiner L-(+)-Milchsäure in Form von Ammoniumlactat umgesetzt. Die optische Reinheit betrug mehr als 99,5%, und die Ausbeuten der Fermentationen lagen, bezogen auf den Stärkegehalt des Substrats, bei > 98 %.

[0030] Die Fermentationsbrühe wurde mit einer Siebschnecken zentrifuge grob vorgeklärt, wobei als Nebenprodukt ein Feststoff mit etwa 30 % Trockensubstanz anfiel, der, gegebenenfalls nach Wäsche mit Wasser und Trocknung, als Tierfutter verwendbar ist. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt, zum Denaturieren von Proteinen 1 Stunde lang bei 80 bis 90°C gehalten und anschließend über Keramikmembranen mit einem nominellen Cut-off von 3 kDa filtriert. Die Filtration erfolgte bei 90 bis 95°C nach dem Querstromprinzip. Der Konzentrationsfaktor bei dieser Filtration lag bei etwa 16. Die aufkonzentrierten Feststoffe wurden mit Wasser versetzt und einer Diafiltration unter sonst gleichen Bedingungen unterworfen. Die nach der Diafiltration verbleibende Feststoffsuspension wurde in einer

anaeroben Kläranlage zur Biogasgewinnung genutzt. Das Filtrat wurde auf einer mehrstufigen Eindampfanlage auf eine Dichte von 1,2 aufkonzentriert, dieses Konzentrat wurde nach erneuter Einstellung des pH-Werts auf 2,2 als Feedlösung einer kontinuierlichen Chromatographieanlage zugeführt.

[0031] Die chromatographische Reinigung erfolgte auf an sich bekannte Weise nach dem SMB-Prinzip ("simulated moving bed", simuliertes Fließbett) auf einem Anionenaustauscherharz bei 65°C mit Wasser als Trennmedium. Es wurden zwei Produktströme, enthalten, wovon eine Fraktion im Wesentlichen die gesamte Milchsäure sowie Spuren von Ammoniumsulfat und die zweite Fraktion neben Ammoniumsulfat noch etwas freie Schwefelsäure, alle vom Mikroorganismus nicht verwertbaren Zucker und Proteine sowie einen Großteil der färbenden Bestandteile enthielten. Die Ammoniumsulfatfraktion wurde nach einer Behandlung mit Aktivkohle durch Vakuumverdampfung aufkonzentriert und zweistufig kristallisiert. Dabei wurde auf eine möglichst grobe Kornstruktur Wert gelegt, da die Korngröße den Wert als Nebenprodukt anfallenden Wertstoffs bestimmt. Die Ammoniumsulfat-Kristalle sind beispielsweise entweder direkt oder in Kombination mit weiteren Bestandteilen als Mineraldünger einsetzbar, und die Mutterlauge der Kristallisation kann als kostengünstiger Flüssigdünger Verwendung finden.

[0032] Die Milchsäurefraktion wurde mit Aktivkohle entfärbt und mit einer mehrstufigen Eindampfanlage auf etwa 80 % aufkonzentriert. Falls die Rohstoffe (vor allem das verwendete Wasser) zu hohe Chloridbelastung aufweisen, kann es sinnvoll sein, vor dem Eindampfen einen zusätzlichen Ionenaustausch-Schritt vorzusehen, um Korrosion der Anlage zu verhindern. Die etwa 80 %ige Milchsäure wurde möglichst rasch und schonend auf einem Fallstromverdampfer oder Kurzwegverdampfer entwässert und ohne Zwischenlagerung in einem zweiten Kurzwegverdampfer destilliert. Alle Eindampf- und Destillationsschritte wurden zur Minimierung der Milchsäurepolymerisation bei möglichst niedrigen Temperaturen und in kurzem zeitlichem Abstand durchgeführt. Bei der Destillation wurde ein Schnittverhältnis von etwa 80 % eingestellt, wodurch der Destillationsrückstand noch einen signifikanten Anteil an freier Milchsäure enthält. Höhere Ausbeuten in diesem Schritt beeinflussen jedoch nach den Erkenntnissen der Erfinder die Produktqualität und dabei besonders die Färbung negativ. Der Destillationsrückstand enthält die aufkonzentrierten Verunreinigungen, freie Milchsäure sowie Oligomere der Milchsäure. Diese Oligomere werden mit Wasser bei erhöhter Temperatur hydrolysiert und die Lösung zur Abtrennung von Verunreinigungen erneut den obigen Verfahrensschritten einschließlich der chromatographischen Trennung unterzogen.

[0033] Die destillierte Milchsäure wird zur Vermeidung von Kristallisation auf einer Temperatur von über 55°C gehalten und möglichst rasch auf die handelsübliche Konzentration von 80 bis 90 % verdünnt.

BEISPIEL 1

[0034] Eine Milchsäurelösung nach der chromatographischen Reinigung als Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem Gehalt von 25,4 % Milchsäure und 0,13 % Sulfat in Form von Ammoniumsulfat wurde durch Leiten über eine Aktivkohlesäule bei 60°C entfärbt. Die entfärbte Lösung wies eine Extinktion von 0,354 (gemessen bei 405 nm in 1 cm Schichtdicke) auf. Diese Lösung wurde in zwei Teile getrennt. Ein Teil wurde durch Behandlung mit einem stark sauren Kationentauscher (DOWEX HCR-S) und anschließend einem schwach basischen Ionentauscher (Amberlite A830) vollkommen von anorganischen Ionen befreit, der andere Teil blieb unbehandelt. In der entionisierten Lösung waren weder Sulfat noch Chlorid und nur Spuren von Ammonium nachweisbar. Beide Lösungen wurden auf einem Rotationsverdampfer bei 80°C unter identischen Bedingungen entwässert und sofort darauf auf einer Kurzwegdestillationsapparatur der Fa. UIC destilliert. Für die Entwässerung wurde ein linearer Druckgradient von 450 bis 20 mbar über 2 Stunden angelegt. Die Destillation wurde bei etwa 3 mbar, einer Vorlauftemperatur von 120°C, einer Kondensatortemperatur von 55°C und einer Wischerdrehzahl von 350 min⁻¹ betrieben. Die Vakuumanlage wurde mit einer bei -40°C betriebenen Kühlfalle geschützt. Von den Destillaten wurde die Farbe bei 405 nm sofort nach der Destillation sowie nach Erhitzen auf 180°C über 30 Minuten bestimmt. Die Messergebnisse sind zusammen mit

den Ausbeuten des Destillationsschritts c) des erfindungsgemäßen Verfahrens, bezogen auf den Gesamtgehalt an Milchsäure, in der nachstehenden Tabelle 1 angegeben.

TABELLE 1

	Ausbeute bei der Destillation	Farbe sofort	Farbe nach 30 min 180°C
entionisiert	82,0 %	0,012	0,033
nicht entionisiert	82,7 %	0,010	0,034

[0035] Es ist klar ersichtlich, dass sich die beiden Produkte im Rahmen der Messgenauigkeit nicht unterscheiden. Der Ionenaustauschschritt brachte demnach keine Vorteile für die Produktreinheit. Beide Destillate kristallisierten beim Abkühlen auf unter 55°C sofort aus.

BEISPIEL 2

[0036] Milchsäurelösungen wie zuvor beschrieben, d.h. nach chromatographischer Reinigung und mit bzw. ohne anschließendem/-n Ionenaustausch, wurden auf ihre Neigung zur Polymerisation untersucht. Jeweils 200 g der Lösung wurden bei 80 bzw. 100°C auf einem Rotationsverdampfer bei 90 min⁻¹ entwässert. Der Druck wurde innerhalb von 60 Minuten von 400 auf 20 mbar gesenkt und dann stabil gehalten. Gemessen wurde der Gehalt an freier Milchsäure durch Titration mit 1 N Lauge gegen Bromthymolblau als Indikator und der Gesamtgehalt an Milchsäure durch Rücktitration einer mittels 1 N Lauge unter Sieden hydrolysierten Probe mit 1 N Salzsäure.

TABELLE 2

Temperatur	Freie Milchsäure	Gesamte Milchsäure	Polymerisationsgrad	Entionisiert
100 °C	24,5 %	25,0 %	2,2 %	JA
80°C	24,5%	25,0 %	2,2 %	JA
80°C	26,7 %	27,3 %	2,2 %	JA
100°C	28,5 %	29,0 %	1,7%	NEIN
80°C	36,8 %	37,5 %	2,0 %	JA
100°C	71,8%	73,5 %	2,2 %	NEIN
80°C	83,8 %	86,1 %	2,7 %	JA
80°C	94,7 %	96,8 %	2,3 %	NEIN
100°C	94,1 %	97,6 %	3,7 %	JA
80 °C	93,3 %	97,8 %	4,7 %	NEIN
80°C	94,8 %	98,0 %	3,3 %	JA
80 °C	93,5 %	98,1 %	4,9 %	JA
80 °C	91,6%	99,6 %	8,7 %	NEIN
100°C	92,6 %	99,9 %	7,9 %	JA
100°C	94,3 %	100,4%	6,5 %	NEIN
100 °C	90,8 %	100,9%	11,1 %	JA
80 °C	92,6 %	101,0%	9,0 %	NEIN
100 °C	92,9 %	102,2%	10,0 %	NEIN
100°C	90,0 %	103,1 %	14,6 %	NEIN

[0037] (Werte über 100 % für die Gesamtmilchsäure sind durch den polymerisierten Anteil bedingt.)

[0038] Es ist deutlich erkennen, dass der Polymerisationsgrad nur eine Funktion des Gesamtmilchsäuregehalts war. Ab einer Konzentration von etwa 97 % Milchsäure begannen die Proben, in signifikantem Ausmaß zu polymerisieren. Besonders gut geht dies aus der zugehörigen Grafik in Fig. 1 hervor. Eine Abhängigkeit des Polymerisationsgrads von der Gegenwart anorganischer Ionen oder der Temperatur war hingegen nicht zu beobachten, was der Lehre des Standes der Technik widerspricht.

BEISPIEL 3

[0039] Eine Milchsäurelösung nach der chromatographischen Reinigung als Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einem Gehalt von 25,7 % Milchsäure und 0,28 % Sulfat in Form von Ammoniumsulfat wurde durch Leiten über eine Aktivkohlesäule bei 60°C entfärbt. Diese Lösung wurde ohne weitere Behandlung bei 80°C während einer Stunde entwässert, der Druck wurde während dieser Zeit linear von 400 auf 20 mbar gesenkt. Das so erhaltene Konzentrat enthielt 91,7 % Gesamtmilchsäure (gemessen nach Hydrolyse mit 1 N NaOH) wurde sofort darauf mittels einer Kurzwegdestillationsapparatur der Fa. UIC destilliert. Die Destillation wurde bei etwa 7 mbar, einer Vorlauftemperatur von 120°C, einer Kondensatortemperatur von 55°C und einer Wischerdrehzahl von 400 min⁻¹ betrieben. Die Vakuumanlage wurde mit einer bei -40 °C betriebenen Kühlfalle geschützt. Die Ausbeute wurde über die Zulaufgeschwindigkeit variiert. Von den Destillaten wurde die Farbe sofort nach der Destillation sowie nach Erhitzen auf 200°C über 30 Minuten bestimmt. Die Messergebnisse sind zusammen mit den Ausbeuten der Destillationen in nachstehender Tabelle 3 angegeben.

TABELLE 3

Ausbeute der Destillation	APHA sofort	APHA nach 200°C für 30 min
57,6 %	3,3	59,3
60,3 %	3,6	72,2
80,8 %	4,3	136,0

[0040] Es ist zu erkennen, dass die Produktqualität stark von der gewählten Ausbeute, d.h. vom Schnittverhältnis der Destillation in Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens abhängig war. Bei entsprechend niedrigem Schnittverhältnis ist ein qualitativ hochwertiges Produkt auch mit einem nicht komplett entwässerten Feed erhältlich.

BEISPIEL 4

[0041] Das obige Beispiel wurde im Wesentlichen wiederholt, allerdings wurde der Polymerisationsgrad der Milchsäurelösung anhand unterschiedlich langer Verweilzeit bei 80°C und 20 mbar variiert. Bei der Kurzwegdestillation in Schritt c) des Verfahrens wurde ein konstantes Schnittverhältnis von 70 % Destillat eingestellt. Die Messergebnisse der Farbmessungen und des Polymerisationsgrads sind in nachstehender Tabelle 4 angegeben.

TABELLE 4

Polymerisationsgrad (%)	APHA Sofort	APHA nach 200°C für 30 min
3,30	8	130
5,20	4	102
6,30	4	86
6,50	3	57
11,20	5	128
11,89	6	182
26,10	131	1117

[0042] Der optimale Bereich dürfte im Hinblick auf die Produktqualität demnach bei Polymerisationsgraden zwischen etwa 5 und 10% liegen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren eine Rückführung des Destillationsrückstands unter Hydrolyse etwaiger vorhandener Polymerisate erfolgt, kann somit ein guter Kompromiss zwischen Ausbeute, Wassergehalt, Polymerisationsgrad und Produktreinheit eingegangen werden.

BEISPIEL 5 (BEZUGSBEISPIEL)

[0043] Im Handel erhältliche reine Milchsäure (90%ig rein, vertrieben von der Fa. VWR) wurde mit entionisiertem Wasser auf 25 % verdünnt und zur Hydrolyse von Oligomeren 16 Stunden lang rückflusserhitzt. Ein Teil dieser so erhaltenen Milchsäurelösung wurde mit 0,2 % Sulfationen in Form von freier Schwefelsäure versetzt, ein anderer Teil wurde mit der gleichen Sulfatmenge, jedoch in Form von Ammoniumsulfat versetzt. Je 200 ml der so behandelten Lösungen wurden bei 110°C am Rotationsverdampfer entwässert. Der Druck wurde von anfänglich 400 mbar innerhalb einer Stunde auf 20 mbar gesenkt und dann so belassen. Alle 30 Minuten wurden Proben entnommen und sowohl die freie als auch die gesamte vorhandene Milchsäure wie oben beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5

Zeit (min)	Vakuum (mbar)	+ 0,2 % H ₂ SO ₄				+ 0,2 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (ber. als Anion)			
		MS frei (%)	MS gesamt (%)	Polymerisations- grad (%)	Polymerisations- grad (%)	MS frei (%)	MS gesamt (%)	Polymerisations- grad (%)	Polymerisations- grad (%)
0	400	24,69	25,25	2,22	2,22	24,69	25,25	2,22	2,22
30	210	29,49	30,31	2,72	2,72	31,82	32,19	1,14	1,14
90	20	53,00	112,63	52,95	52,95	94,41	99,82	5,42	5,42
120	20	16,56	118,44	86,02	86,02	91,68	99,88	8,21	8,21

[0044] Aus den obigen Ergebnissen ist - speziell bei Vergleich mit jenen der Beispiele 2 und 4 -

deutlich zu erkennen, dass die Polymerisation durch das Neutralsalz kaum, durch die freie Säure aber in hohem Ausmaß katalysiert wird. Dies widerlegt erneut klar die bisher anerkannte Lehre, wonach sämtliche ionischen Verbindungen als Auslöser unerwünschter Polymerisation abzutrennen seien.

BEISPIEL 6 (BEZUGSBEISPIEL)

[0045] Der Versuch aus Beispiel 5 mit im Handel erhältlicher Milchsäure wurde im Wesentlichen wiederholt, wobei jedoch kein Sulfat, sondern 1 % Glucose zu einem Teil der Lösung zugesetzt wurde, während der andere Teil ohne Zusatz blieb. Die Entwässerung wurde statt bei 110°C bei 100°C durchgeführt.

Tabelle 6

Zeit (min)	Vakuum (mbar)	ohne Zusatz			+ 1 % Glucose		
		MS frei (%)	MS gesamt (%)	Polymerisations- grad (%)	MS frei (%)	MS gesamt (%)	Polymerisations- grad (%)
0	400	24,62	25,34	2,86	24,62	25,34	2,86
30	210	28,98	29,35	1,25	28,76	29,54	2,63
60	20	64,29	65,20	1,40	54,36	56,54	3,86
90	20	96,00	99,52	3,54	92,57	100,17	7,59
120	20	93,91	100,28	6,36	89,61	100,55	10,88
150	20	90,98	100,94	9,87	85,89	100,66	14,67

[0046] Es ist klar zu erkennen, dass auch nichtionische Verbindungen wie Glucose die Polymerisation fördern können, weswegen deren chromatographische Abtrennung in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt.

BEISPIEL 7

[0047] Frisch destillierte Milchsäure aus Beispiel 1 (ohne Ionentausch) wurde mit jeweils 100 ppm - und in einem Fall zum Vergleich auch mit 500 und 1000 ppm - an unterschiedlichen Substanzen versetzt und danach 2 Stunden lang im Ölbad auf 200°C erhitzt. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die Farbe gemessen.

TABELLE 7

zugesetzte Substanz	Konzentration (ppm)	APHA nach 200°C für 2 h
keine	0	58,0
FeSO ₄	100	55,3
MnSO ₄	100	64,1
KH ₂ PO ₄	100	65,4
MgSO ₄	100	66,4
Glucose	100	610,5
Fructose	100	667,0
Methionin	100	62,3
Glycerin	100	56,5
Lysin	100	65,7
Glutaminsäure	100	54,0
Asparaginsäure	100	57,8
Maltose	100	541,0
Maltose	500	2981,0
Maltose	1000	nicht messbar
Sorbit	100	84,9
Erythrit	100	93,5
Ribit	100	90,0
Arabit	100	80,0

[0048] Die obigen Ergebnisse verdeutlichen, dass anorganische Salze und Aminosäuren keinen, nicht-saccharidische Polyole einen geringen, Zucker aber einen sehr starken Einfluss auf die Färbung haben. Der Einfluss von Zuckern auf die Färbung ist zudem stark konzentrationsabhängig. Durch die Abtrennung von während der Fermentation nicht verbrauchtem Zucker mittels der chromatographischen Reinigung als Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher sowohl die Polymerisation unterdrückt als auch eine übermäßige Verfärbung des Produkts verhindert.

BEISPIEL 8

[0049] Beispiel 3 wurde wiederholt und jeweils der Gehalt an Sulfationen im Feed und im Destillat der Kurzwegdestillation als Schritt c) des Verfahrens mittels Ionenchromatographie bestimmt. Aus der Konzentrationsdifferenz wurde errechnet, wie viel Sulfat durch Spritzen ins Destillat gelangt war. In Tabelle 8 sind die Destillationsausbeute (in Prozent des Feeds) und die Menge an in das Destillat übergegangenen Sulfats (in Prozent des Sulfatgehalts im Feed) angegeben.

TABELLE 8

Ausbeute (%)	Sulfat-"Splashing" (%)
57,6	2,6
59,6	2,6
60,3	2,5
65,0	2,4
68,5	2,9
77,7	3,4
80,8	3,9
89,3	8,2
90,0	7,1

[0050] Man erkennt deutlich, dass die Reinigungsleistung bei Ausbeuten über 80 % stark abnimmt. Die Erfinder nehmen an, dass der Grund dafür das bei steigender Viskosität des Rückstands während der Destillation verstärkter auftretende Spritzen ist.

DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

[0051] Zusammenfassend belegen die obigen Beispiele somit die folgenden Erfahrungen und Beobachtungen der Erfinder: Die Qualität einer destillativ erhaltenen Milchsäure hängt maßgeblich vom Polymerisationsgrad des Feeds zur abschließenden Reindestillation, vom Ausmaß des Spritzens der Lösung während dieses normalerweise als Kurzwegdestillation ausgelegten Schritts sowie vom Schnittverhältnis, d.h. von der angestrebten Ausbeute der abschließenden Destillation ab.

[0052] Das Spritzen wurde bereits in der eingangs zitierten US 7410556 B1 beschrieben, wo das Problem durch die Verwendung von Kolonnen zumindest teilweise gelöst wurde. Kolonnen sorgen jedoch für zusätzliche Druckverluste, wodurch die thermische Belastung für die Hydroxycarbonsäure, aber auch der Energieverbrauch steigen. Spritzverluste bei der Kurzwegdestillation treten sowohl bei unvollständig entwässerten als auch, aufgrund der erhöhten Viskosität, bei zu stark polymerisiertem Feed auf und bewirken eine starke Verschlechterung der Produktqualität, die sich besonders durch Verfärbungen beim Erhitzen auf 200 °C zeigt. Wegen des geringen Arbeitsdrucks einer Kurzwegdestillation ist natürlich immer zu verhindern, Leichtsieder wie Wasser in den Destillationsraum einer Kurzwegdestillation einzubringen, da einerseits der Filmaufbau im Apparat durch die explosionsartige Verdampfung dieser Leichtsieder gestört wird und andererseits die Vakuumanlage durch die großen Brüdenmengen übermäßig belastet wird. Wie speziell in Beispiel 3 gezeigt wurde, sind nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hochreine Hydroxycarbonsäuren jedoch auch mit einem nicht vollständig entwässerten Feed der Reindestillation erhältlich, wenn das Schnittverhältnis entsprechend niedrig gewählt wird. Dass es dabei dennoch zu keinen Produktverlusten kommt, liegt an der Rezyklierung des Destillationsrückstands in Schritt d) des Verfahrens der Erfindung.

[0053] Dennoch wird vorzugsweise wasserfrei gearbeitet, auch wenn dies, wie in Beispiel 2 gezeigt wurde, zu mehr oder weniger starker Polymerisation der Hydroxycarbonsäure führt. So beginnt beispielsweise bei Milchsäure die Oligomerisierung ab einem Gehalt von rund 97 % stark zuzunehmen, wobei dieses Verhalten im Bereich von 80 bis 110°C nicht von der Temperatur abhängig ist. Aufgrund der Rezyklierung und Hydrolyse des Destillationsrückstands stellt ein mäßiger Gehalt an Oligomeren jedoch keinen Ausbeuteverlust dar und bewirkt durch seinen Beitrag zur Verringerung des Spritzens aufgrund der damit einhergehenden Viskositätssteigerung sogar eine Verbesserung der Farbqualität. Dies geht auch aus Beispiel 4 hervor, aus dem sich ein optimaler Bereich für den Polymerisationsgrad bei der Destillation zwischen 5 und 10 % abschätzen lässt. In diesem Bereich ist sichergestellt, dass einerseits kein freies Wasser mehr

enthalten ist und andererseits die Viskosität noch nicht so hoch ist, dass die verdampfende Milchsäure Tröpfchen aus dem Rückstand mitreißt. Speziell bei Zuckern, aber auch bei Zuckeralkoholen (wenn auch in einem geringeren Ausmaß) wurde eine starke Auswirkung auf die Färbung nach Erhitzen auf 200°C gemessen. So bewirkten beispielsweise schon 100 ppm Glucose, Fructose oder Maltose in Beispiel 7 eine Verschlechterung der Farbe nach Erhitzen auf das Zehnfache. Anhand von Messungen der Sulfatmengen im Destillat, wie in Beispiel 8 ausgeführt, liegt das Ausmaß des Spritzens oder "Splashing" bei der Destillation im Bereich von 2 bis 3 %, wobei die eingesetzten 100 pm einer Konzentration von weniger als 0,1 % in der Fermentationslösung entsprechen. Besonders bei Verwendung von unreinen Rohstoffen ist aber immer mit einem gewissen Gehalt an unfermentierbaren Kohlenhydraten am Ende der Fermentation zu rechnen.

[0054] Auch der Polymerisationsgrad der Milchsäure wird von Zuckern (und anderen Polyolen) maßgeblich beeinflusst. Das Ausmaß der Oligomerisation ist somit wesentlich stärker, als in früheren Arbeiten angenommen wurde, von der Gegenwart von Kohlenhydraten (und anderen Substanzen mit Polyol-artiger Struktur) abhängig. So bewirkte der Zusatz von 1 % Glucose in Beispiel 6 nahezu eine Verdoppelung der Polymerisation bei gleicher Gesamtmilchsäure-Konzentration. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits in der US 5.434.241, wenngleich unter einem vollkommen anderen Gesichtspunkt, beschrieben. Dort werden nämlich Glucose und Fructose sowie eine Vielzahl Polyol-artiger Substanzen als Initiatoren der Polykondensation von Milchsäure genannt. Die chromatographische Trennung in Schritt a) des Verfahrens ist eine wirksame Methode, diese Stoffe abzutrennen.

[0055] Was die Auslösung der Polymerisation durch ionische Verbindungen im Allgemeinen anbelangt, wurde von den Erfindern herausgefunden, dass dies - zumindest bei der nach der chromatographischen Reinigung in Schritt a) gegebenen Ionenzusammensetzung des Feeds zur in Schritt c) erfolgenden Reindestillation - nicht auf sämtliche ionische Verunreinigungen zutrifft, wie in der eingangs zitierten WO 98/55442 behauptet wird. Vielmehr wurde in Beispiel 2 bewiesen, dass der Polymerisationsgrad eine Funktion der Gesamtkonzentration der Milchsäure ist, und in Beispiel 5, dass die Kondensation der Milchsäure nur von freien Säuren katalysiert wird. Diese freien Säuren werden aber durch die chromatographische Reinigung in Schritt a) ebenfalls wirksam entfernt, wobei allenfalls Spuren von Neutralsalzen im Produkt verbleiben, die aber die Polymerisation - entgegen der Lehre - nicht beeinflussen.

[0056] Ein wesentlicher Punkt zum Erhalt einer hochreinen Hydroxycarbonsäure ist auch das bei der Destillation in Schritt c) gewählte Schnittverhältnis. Während frühere Dokumente durchwegs eine möglichst hohe Ausbeute in diesem Verfahrensschritt anstreben und zum Teil sogar den Rückstand einer nochmaligen Destillation unterziehen, wird hierin gezeigt, dass die Qualität des Produkts bei zunehmender Ausbeute immer schlechter wird - und das unabhängig vom Ausgangsmaterial. Das Streben nach einer möglichst hohen Destillationsausbeute führt also zwangsläufig zu einer schlechteren Qualität des Endprodukts. Durch Begrenzung des Schnittverhältnisses auf niedrigere Werte von beispielsweise nur etwa 80 % und Rezyklierung des Rückstands - nach vorheriger Hydrolyse zum Zerstören der gebildeten Polymere - vorzugsweise an einen Punkt vor der chromatographischen Reinigung kann eine Anreicherung von nicht-ionischen Verunreinigungen wirksam unterbunden werden, und wird durchwegs Endprodukt von gleichmäßig hoher Qualität erhalten.

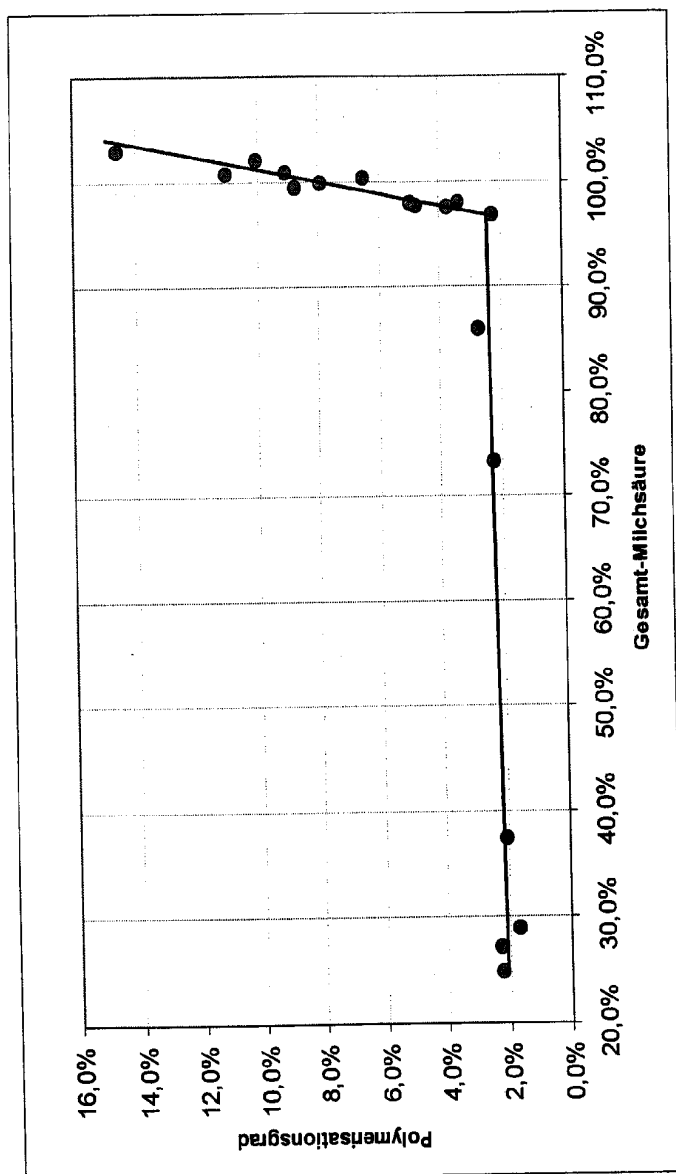
[0057] Somit liefert die vorliegende Erfindung einen wesentlichen Beitrag zum Erhalt von Hydroxycarbonsäuren, insbesondere von Milchsäure, aus Fermentationsbrühen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Hydroxycarbonsäuren durch Fermentation von die gewünschte(n) Hydroxycarbonsäure(n) produzierenden Mikroorganismen und anschließende mehrstufige Reinigung der Fermentationslösung, **dadurch gekennzeichnet**, dass die mehrstufige Reinigung die folgenden Verfahrensschritte, in der angegebenen Reihenfolge, umfasst:

- a) chromatographische Reinigung der Lösung zur Abtrennung von Kohlenhydraten und anderen nichtionischen Komponenten;
 - b) ein- oder mehrstufige Eindampfung zum Erhalt von weitgehend oder im Wesentlichen vollständig entwässerter Hydroxycarbonsäure;
 - c) Vakuumdestillation der so erhaltenen Hydroxycarbonsäure; und
 - d) Rezyklierung des Destillationsrückstands.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hydroxycarbonsäure aus Hydroxypropionsäuren, Hydroxybuttersäuren und Gemischen davon ausgewählt ist.
 3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hydroxycarbonsäure Milchsäure ist.
 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass als chromatographische Reinigung in Schritt a) Adsorptionschromatographie durchgeführt wird.
 5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass in zumindest einer Eindampfstufe in Schritt b) Kurzwegdestillation durchgeführt wird.
 6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Hydroxycarbonsäure bei der Vakuumdestillation in Schritt c) Kurzwegdestillation unterzogen wird.
 7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass Schritt c) nicht mehr als 1 h nach Schritt b) durchgeführt wird.
 8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass Schritt c) nicht mehr als 30 min nach Schritt b) durchgeführt wird.
 9. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass Schritt c) nicht mehr als 10 min nach Schritt b) durchgeführt wird.
 10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der Destillation in Schritt c) ein Schnittverhältnis von etwa 80 % eingestellt wird.
 11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der in Schritt d) rezyklierte Destillationsrückstand, gegebenenfalls nach einer Hydrolysebehandlung, den vorhergehenden Verfahrensschritten ab dem Chromatographieschritt a) erneut unterzogen wird.
 12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass vor einem der Schritte a) bis c), vorzugsweise vor Schritt b), ein zusätzlicher Schritt zur Entfernung ionischer Komponenten durchgeführt wird.
 13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass im zusätzlichen Schritt korrosive Anionen wie Chlorid oder Sulfat entfernt werden.
 14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der Fermentation eine auf Mais basierende Kohlenstoffquelle eingesetzt wird.
 15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Kohlenstoffquelle Maischrot eingesetzt wird.
 16. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass bei der Fermentation Soja-, Raps- oder Sonnenblumenprotein oder ein Gemisch davon als Nährstoff eingesetzt wird.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen.



Figur 1