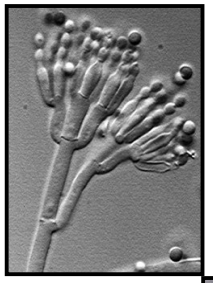
Biotechnology processes Applications

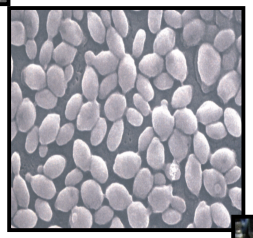
Lecturer:
Dr. Ghassem Amoabediny

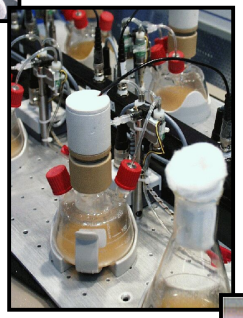
Email contact:
amabedini@ut.ac.ir

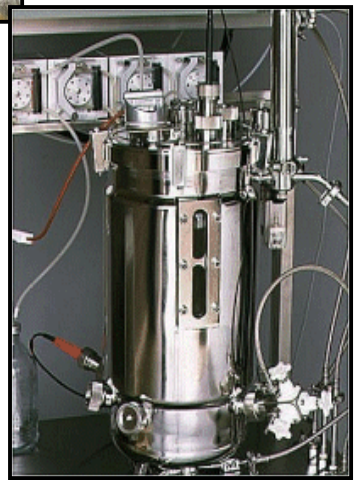
Fall:1386-1387-semester 2

Part 1
Online Monitoring of bioprocess and Scale up





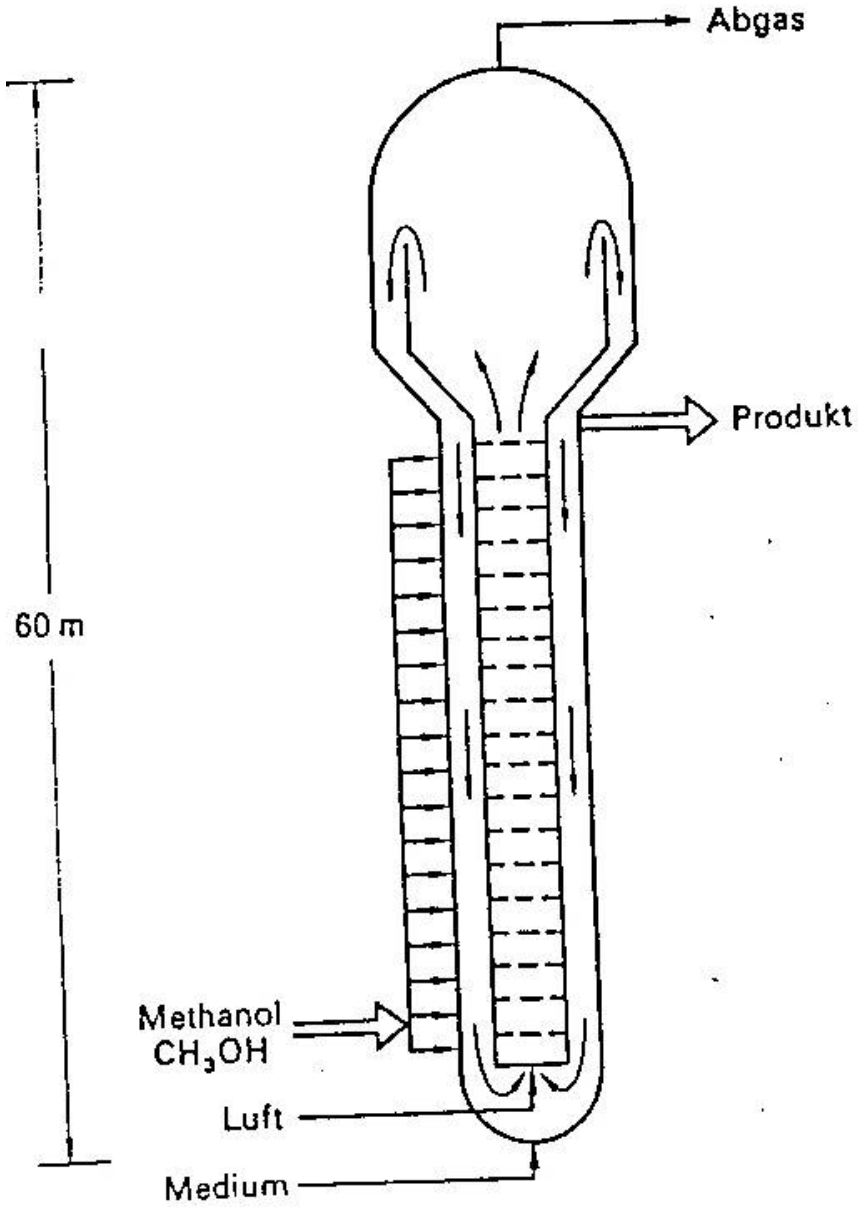


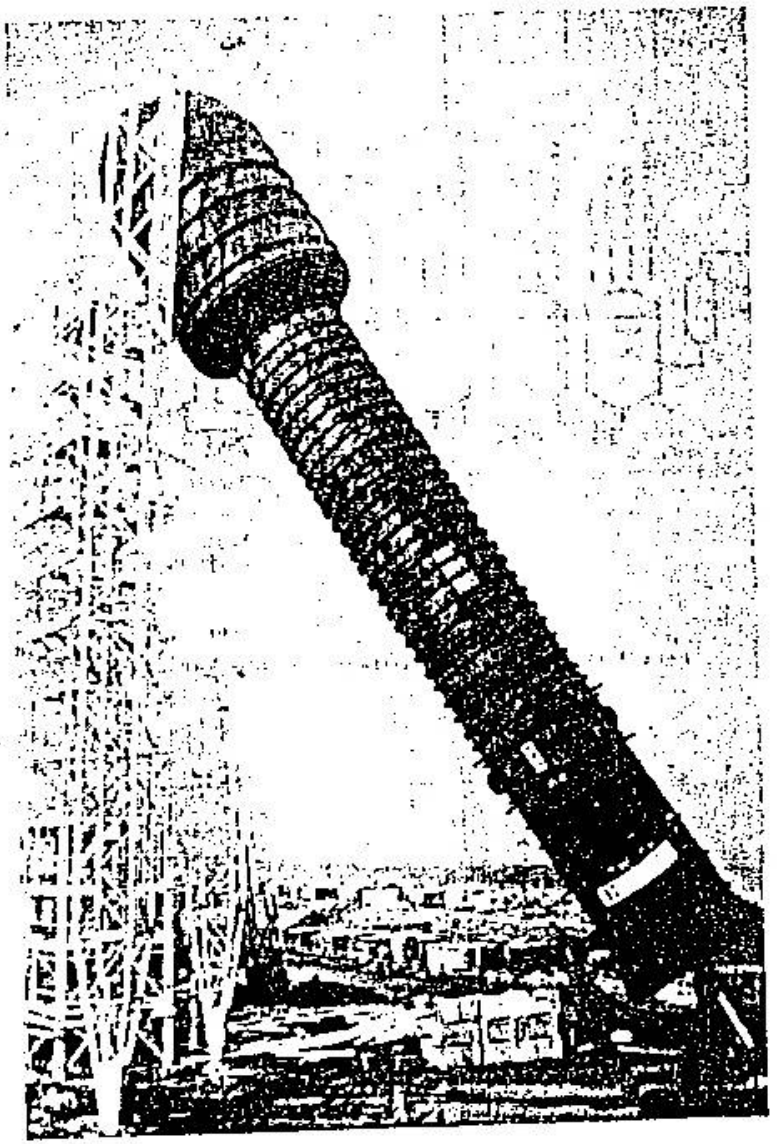


Important engineering parameters of a bioprocess

If no suitable environmental conditions are provided for the microorganisms, they will not perform properly and we may select the wrong candidates. Also essential to obtain meaningful results for scale up.

Technische Umsetzung I: Technikums-Anlage



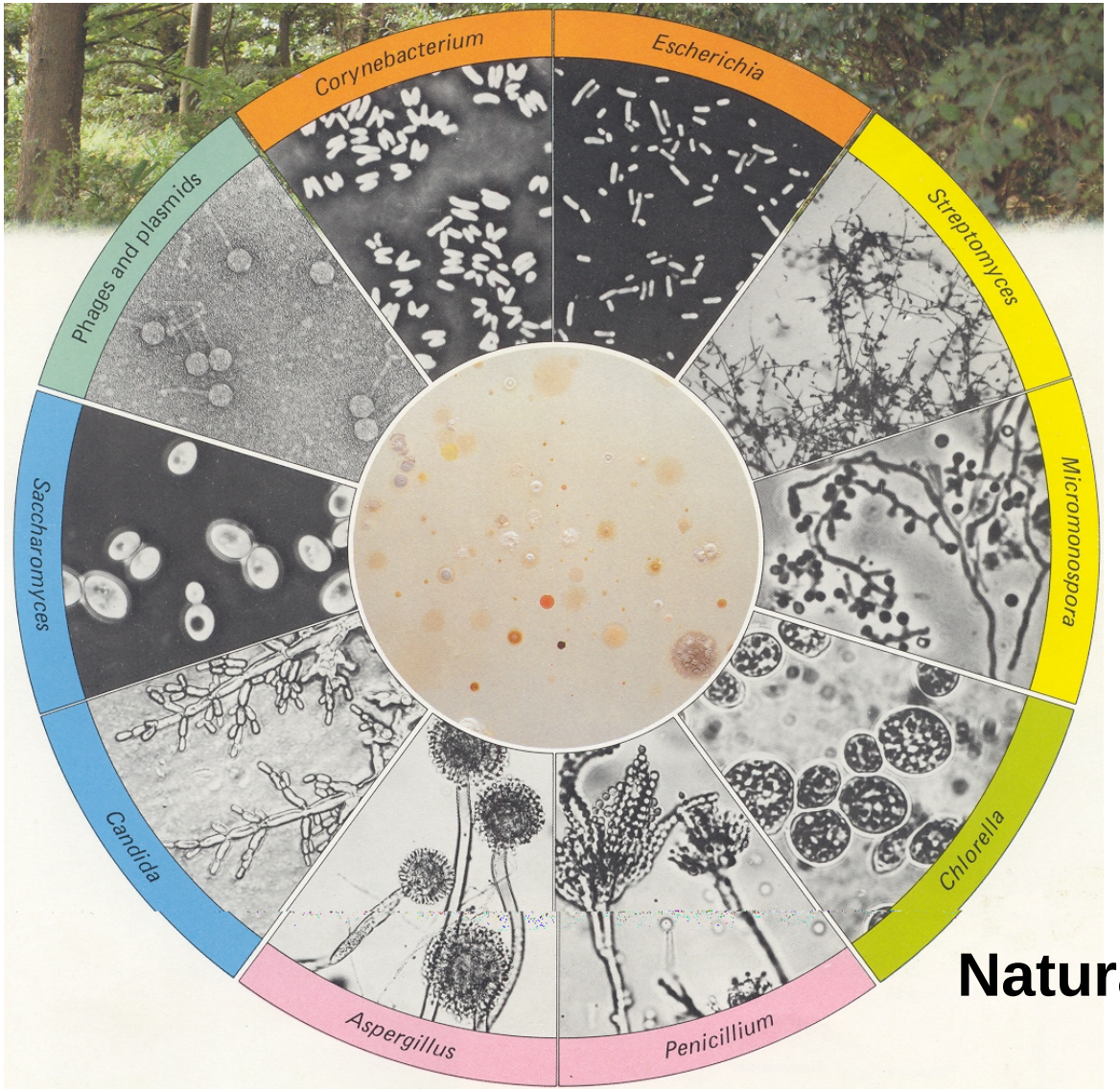


1,500 m³

Fermentations equipments for producing Vitamin B12

Vitamin B2, Roche Vitamine, Grenzach

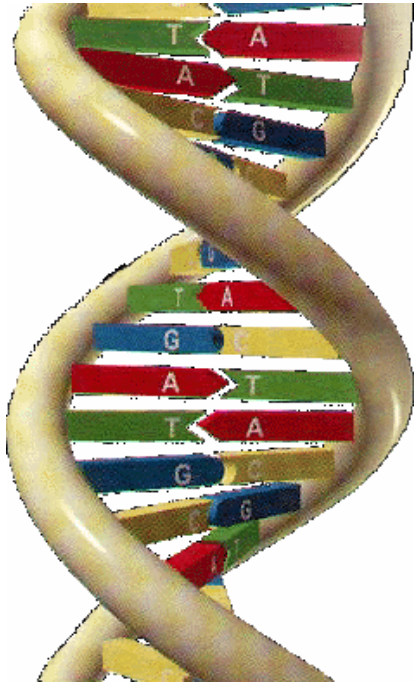
Why do we have to screen among so many variants ?



Natural diversity

Why do we have to screen among so many variants ?

Microorganisms: *E. coli* has 4289 genes



Why do we have to screen among so many variants ?

Due to the large number of possible microbial variants and the low success probability of a single experiment, an extraordinarily large number of experiments have to be conducted.

Why do we have to screen among so many variants ?

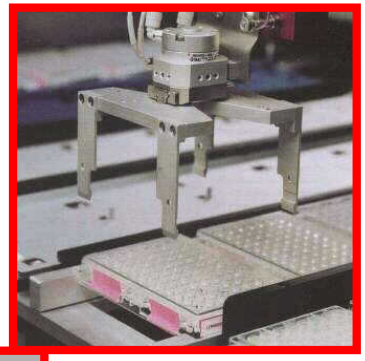
Culture media:

- **Carbon source**
  (glucose, sucrose, starch, molasses, glycerol, methanol, acetate, plant oil, etc.)
- **Nitrogen source**
  (ammonia, urea, nitrate, corn steep liquor, yeast extract, protein hydrolysate, etc.)
- **Phosphorous source**
  (phosphate, phytin)
- **Sulphur source**
  (sulphate, amino acids)
- **Trace elements**
  (Mg, Ca, K, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Se, etc.)
- **Vitamins**
  (biotin, thiamine, pantothenate, riboflavin, etc.)

All these compound's concentration have to be optimised (at relevant operation conditions) !

Modern procedure for bioprocess development

Micro titre plate culture systems

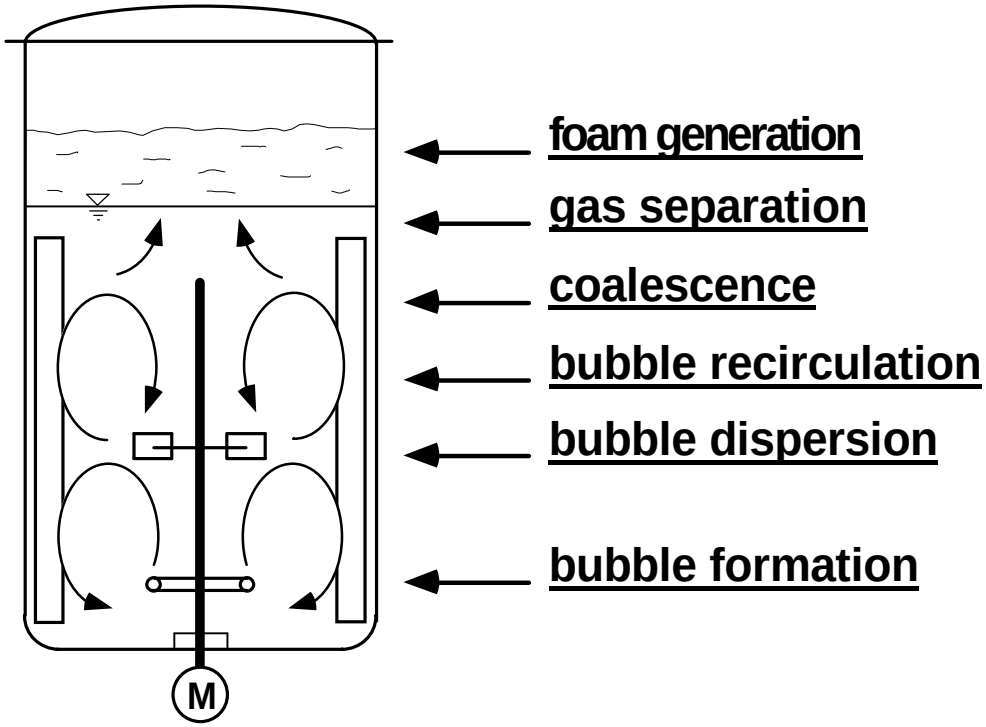


Primary screening with
high throughput (HTS)
5.000 - 40.000/d,
batch-reactions

Scale-up

Determination and control of mass transfer areas of gas/liquid-reactions

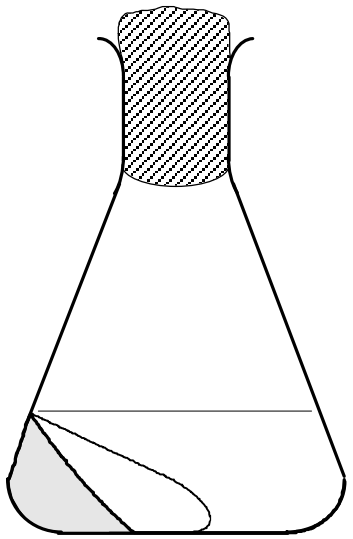
Stirred tank fermentor



difficult to determine

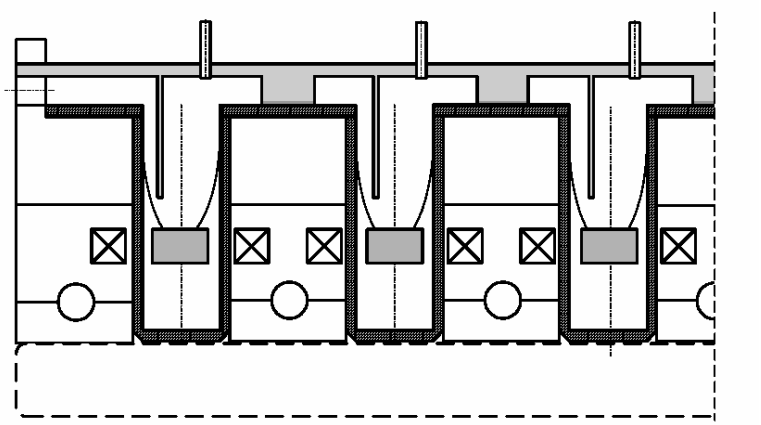
Shaken bioreactors

(without baffles)



easy to determine

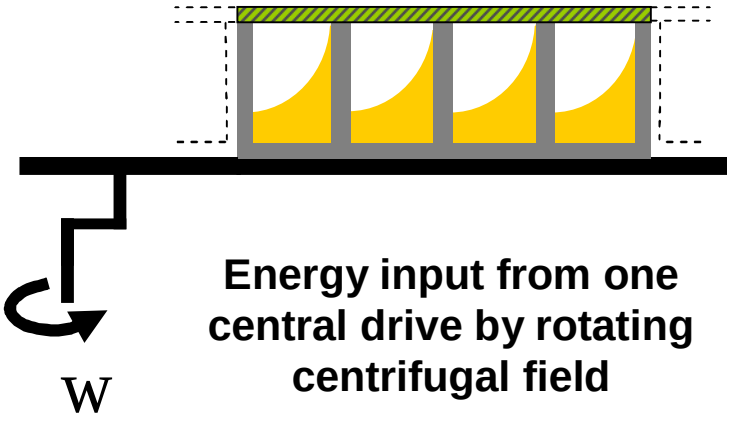
Why application of shaking principle in case of highly parallel bioreactors ?



Input of energy is only possible with dedicated drives for every individual bioreactor

F_z

$F_z = m \cdot r \cdot w^2$



w

Energy input from one central drive by rotating centrifugal field

Oxygen transfer (OTR) in bubble aerated bioreactors

$$OTR = k_L a \times p_{abs} \times L_{O2} \times (y^* - y_L)$$

Different or rather changing concentrations:

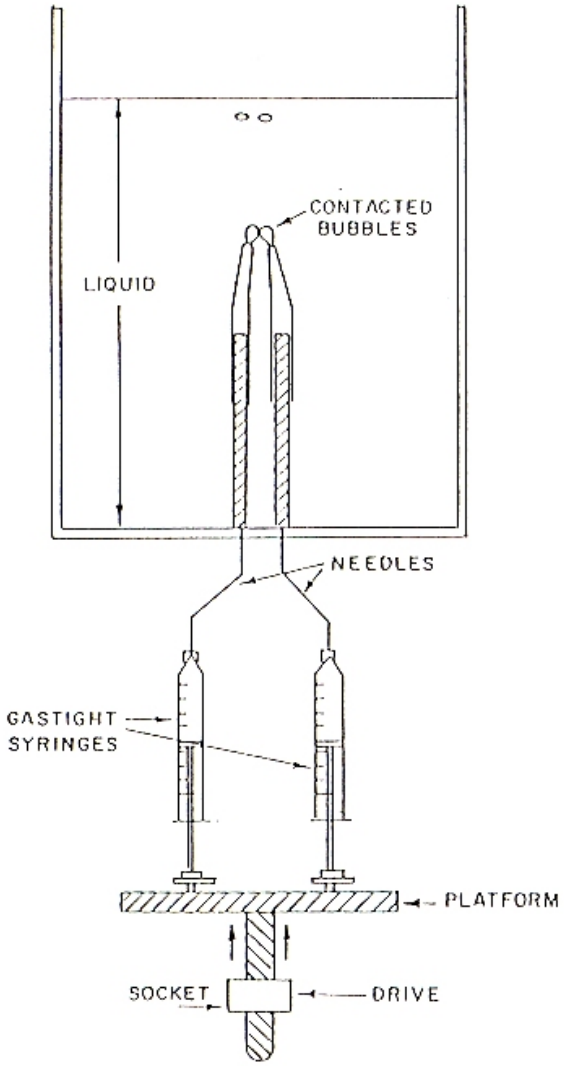
1) slightly influence the oxygen solubility (L_{O2}),

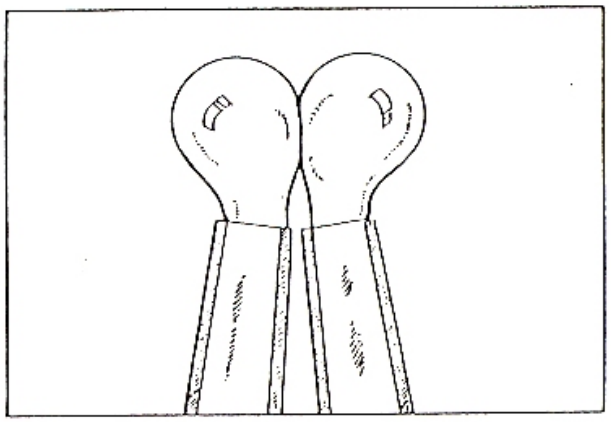
2) slightly influence the mass transfer coefficient (k_L),

3) strongly influence the specific mass transfer area (a).

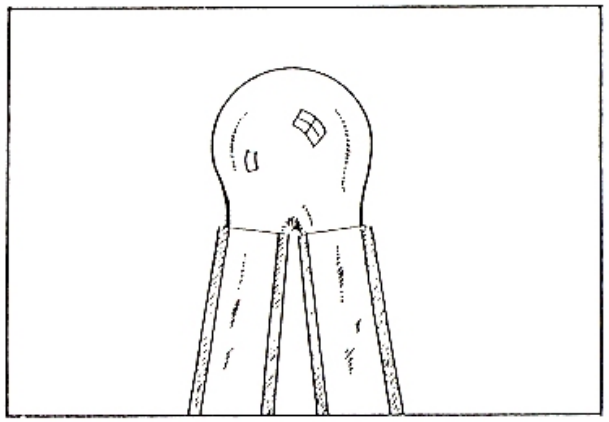
Coalescence phenomenon

from Lessard and Zieminski, 1971





Bubbles in sea water



Bubbles in destilled water

Oxygen transfer (OTR) in unbaffled shaking bioreactors

$$OTR = k_L a \cdot p_{abs} \cdot L_{O2} \cdot (y^* - y_L)$$

Different or rather changing concentrations:

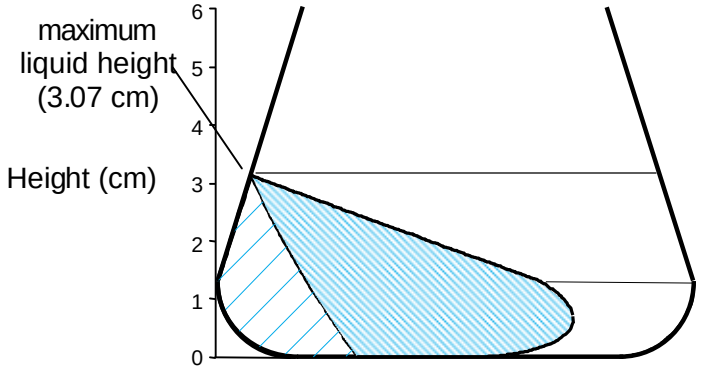
1) slightly influence the oxygen solubility (L_{O2}),

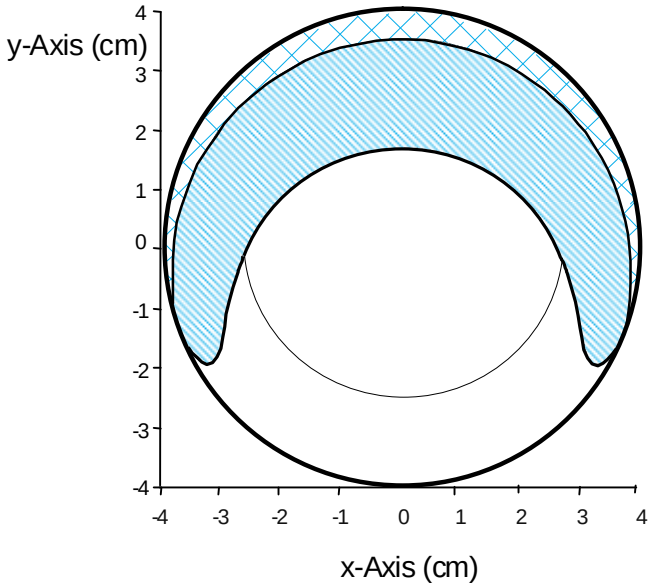
2) slightly influence the mass transfer coefficient (k_L),

3) but do not influence the specific mass transfer area (a).

Calculated liquid distribution in shaking flasks

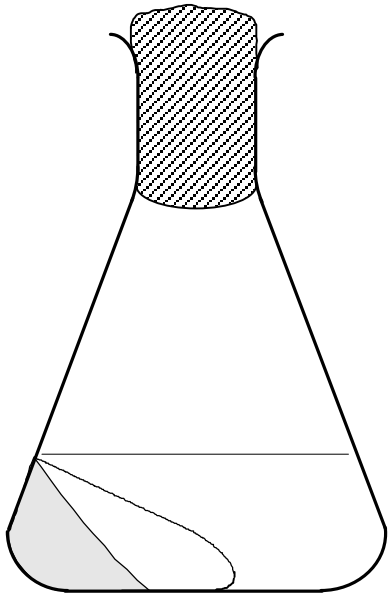
250 ml flask, shaking diameter 25 mm, filling volume 25 ml, shaking frequency 200 rpm

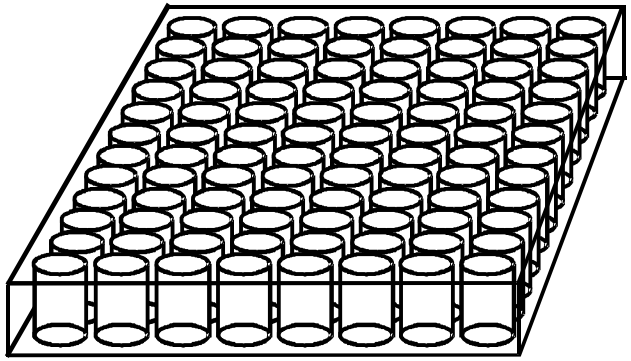




η = 1 mPa s

Important engineering parameters of a bioprocess





1) general hydrodynamics
2) specific power consumption
3) O_2 - supply
4) ventilation (stripping of CO_2, H_2O, alcohols etc.)
5) degree of mixing and homogeneity
6) hydromechanical stress (control of morphology, wall growth)
7) foam generation and its impact
8) dispersion of an organic liquid phase
9) suspension (homogeneity) of solids

A typical correlation for **power input** (in watts) is:

$$P(w) = p_0 \rho \left(\frac{RPM}{60} \right)^3 D^5$$

p_o is the power number of the impeller. For a fully immersed Rushton impeller it is 5, and if it is very near the liquid surface it is less than 5.
ρ is density (kg/m3).
RPM are revolutions per minute.
D is the diameter of the impeller.

A typical correlation for $k_L a$ (in hr^{-1}) is:

$$k_L a = 0.1 \left(\frac{P(w)}{M} \right)^{0.4} \upsilon_{gs}^{0.6}$$

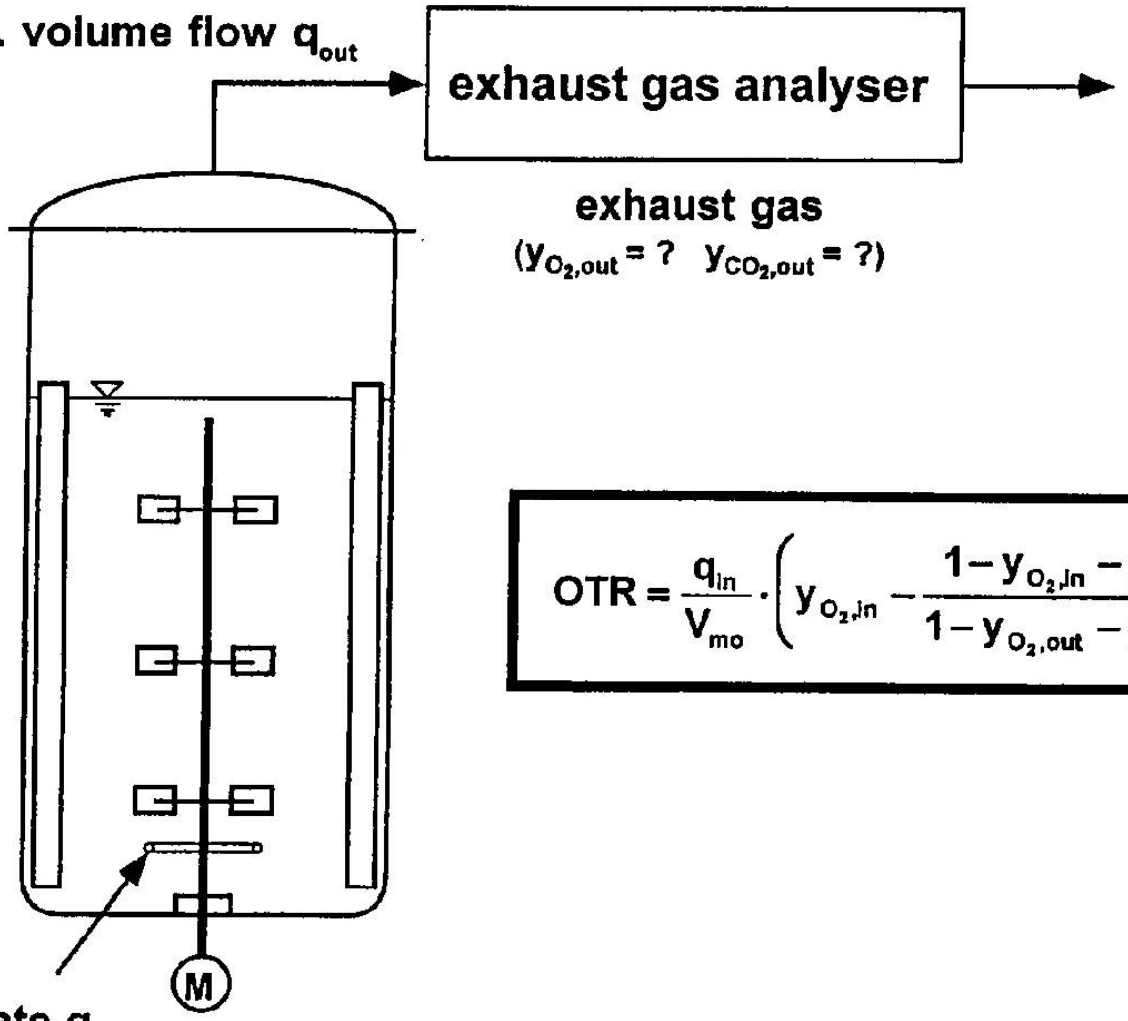
(Empirical)

$$OUR = k_L a \left(C^* - C_L \right)$$

OUR is oxygen uptake rate.
C^* is the sat'n concentration of O_2.
C_L is the actual DO.

M is the mass of the fluid.
0.1 is experimentally determined (should be determined for each culture broth).
υ_{gs} is superficial gas velocity.

Investigation of the oxygen transfer rate (OTR) applying a gas balance



$$OTR = \frac{q_{in}}{V_{mo}} \cdot \left(y_{O_2,in} - \frac{1 - y_{O_2,in} - y_{CO_2,in}}{1 - y_{O_2,out} - y_{CO_2,out}} \cdot y_{O_2,out} \right)$$

Parameters for estimation of oxygen mass transfer

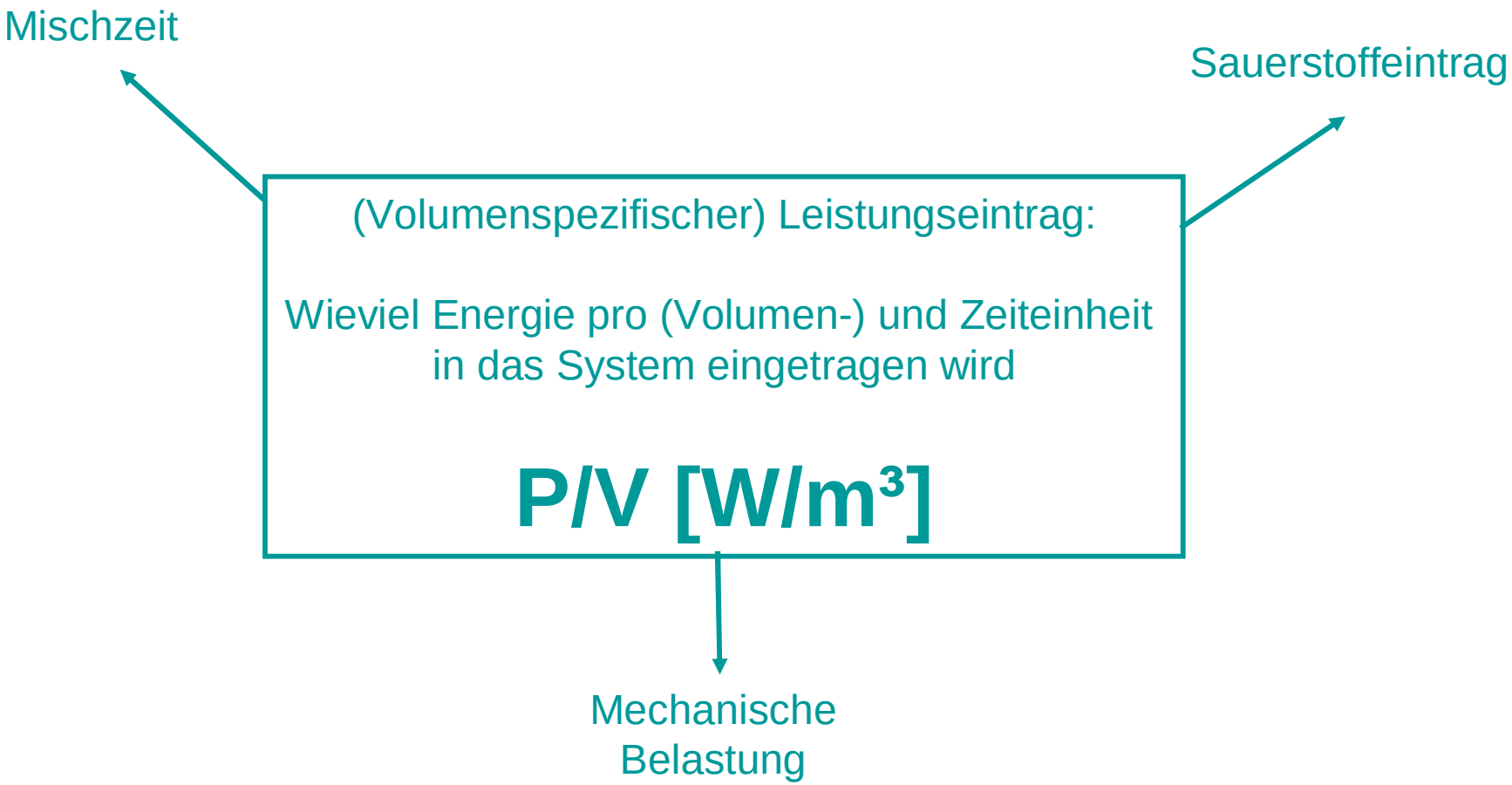
$$k_l a_d = k u_s^{\alpha} \left(\frac{P}{V_l} \right)^{\beta}$$

Medium	k	α	β	Agitator	Reference
Coalescing	0.025	0.5	0.4	Six-bladed Rushton turbines	Moo-Young and Blanch (1981)
	0.00495	0.4	0.593	Six-bladed Rushton turbines	Linek *et al.* (1987)
	0.01	0.4	0.475	Various agitators	Moo-Young and Blanch (1981)
	0.026	0.5	0.4	Not specified	van't Riet (1979)
Noncoalescing	0.0018	0.3	0.7	Six-bladed Rushton turbines	Moo-Young and Blanch (1981)
	0.02	0.4	0.475	Various agitators	Moo-Young and Blanch (1981)
	0.002	0.2	0.7	Not specified	van't Riet (1979)

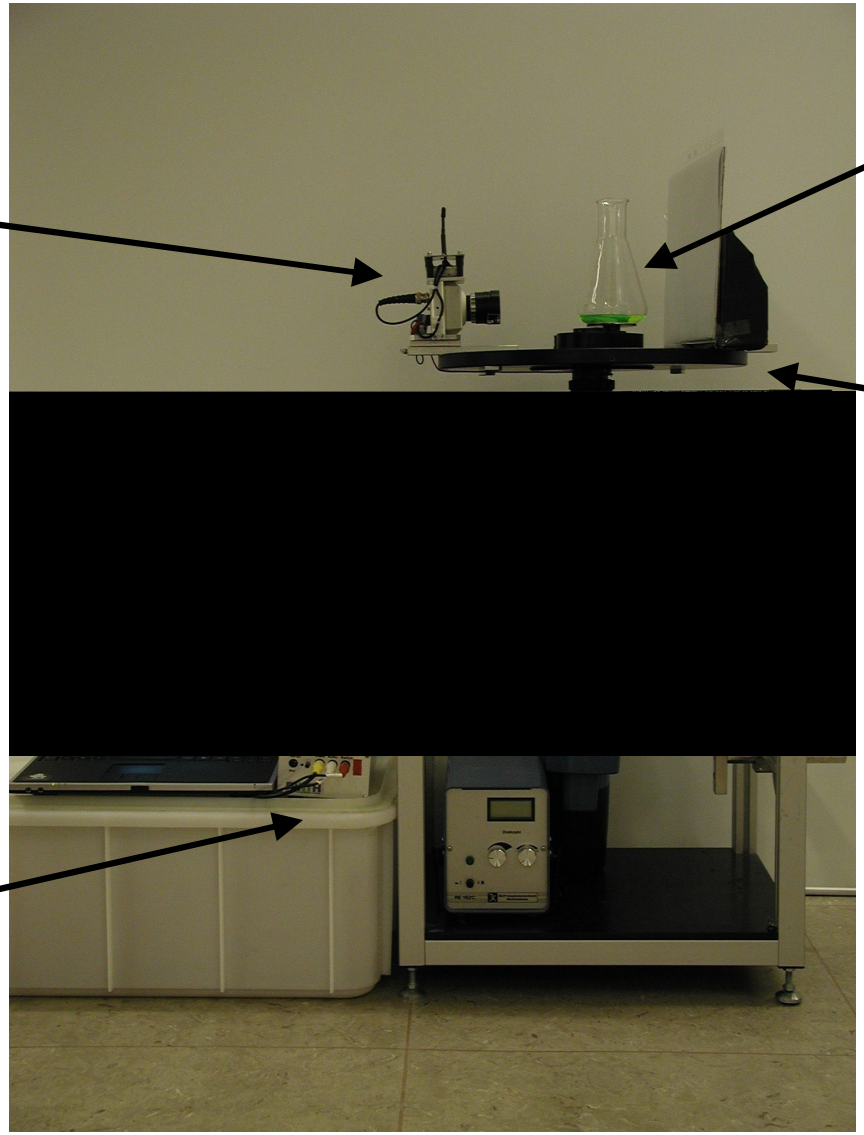
[a]Parameter values are specified in SI units, i.e., the power input is in W m^{-3} and the superficial gas flow rate is in m s^{-1}.

RWTH
BIOVERFAHRENSTECHNIK AACHEN

Was ist Leistungseintrag?



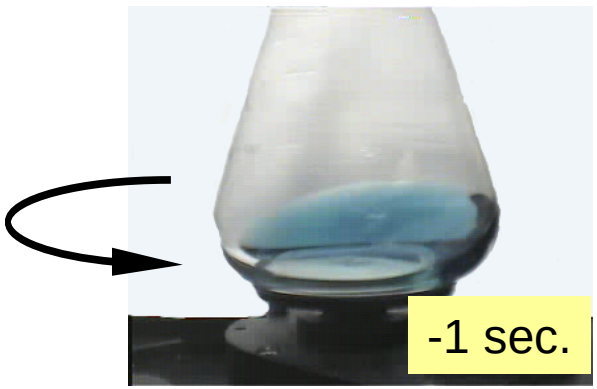
Rotating camera for investigation of hydrodynamics in shake flasks

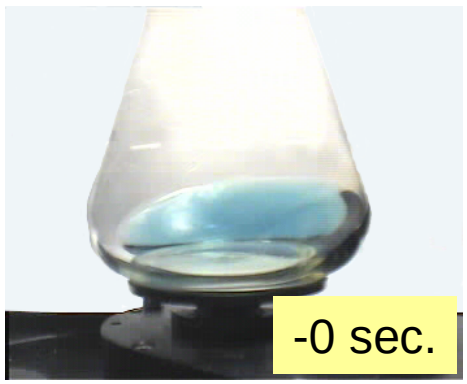


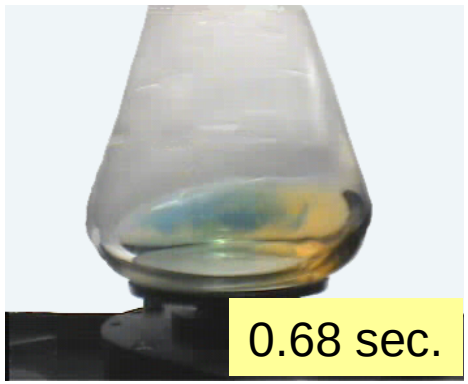
Analysis by classic last streak method

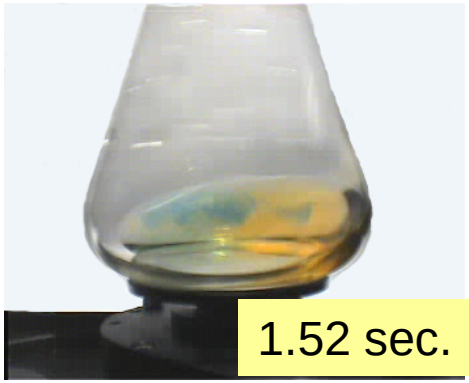
Shake flask volume 250 ml, liquid volume 25 ml,
shaking diameter 50 mm, shaking frequency 117 rpm

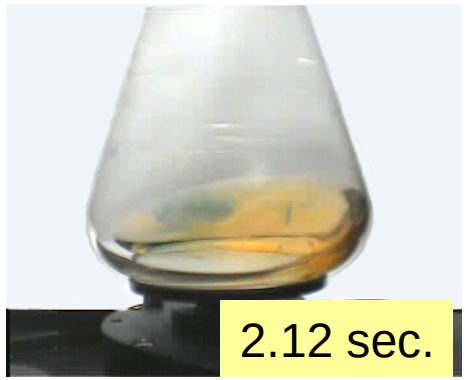
Video sample rate: 25 frames per second => 1 Frame = 0.04 sec.



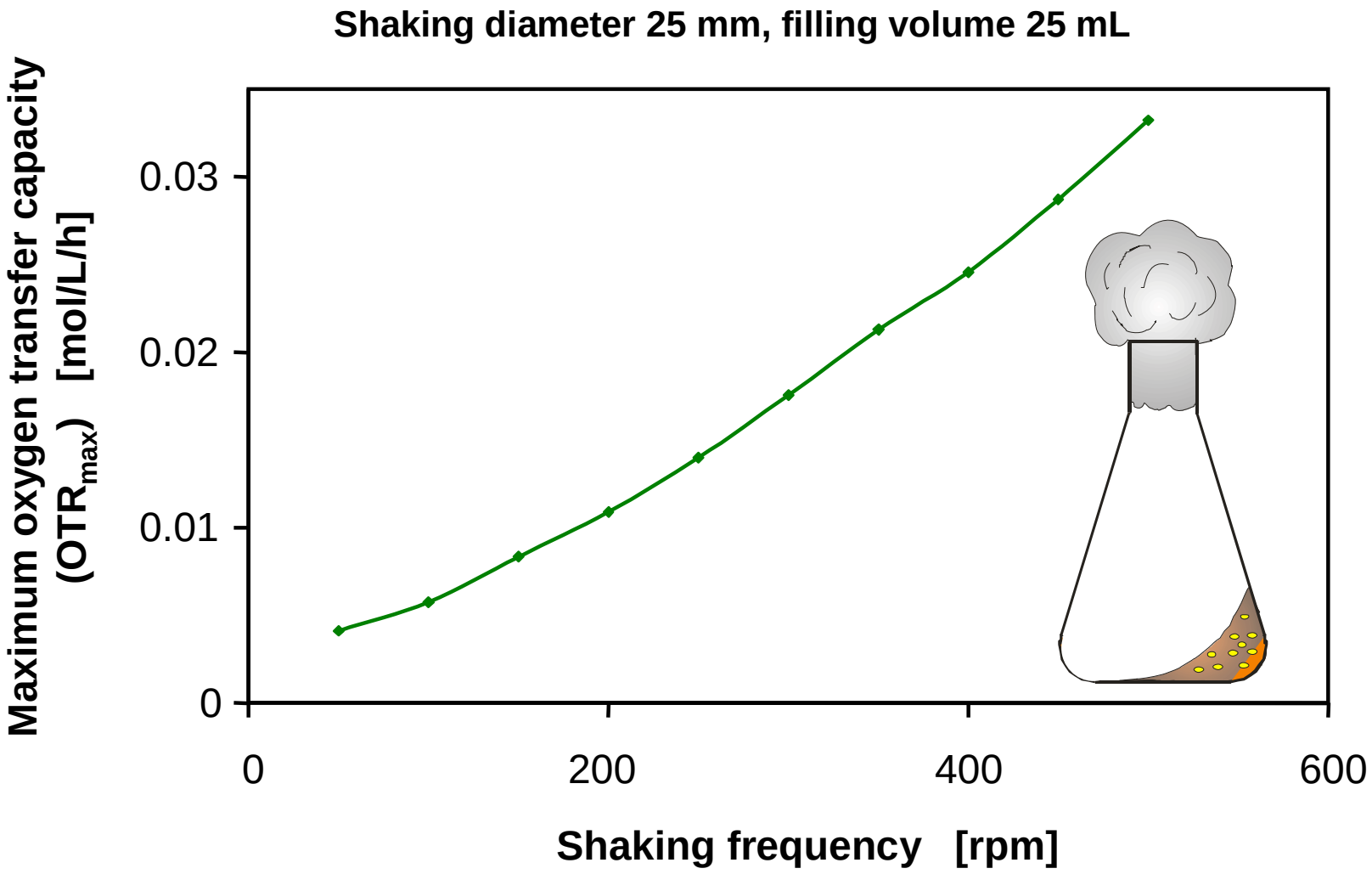








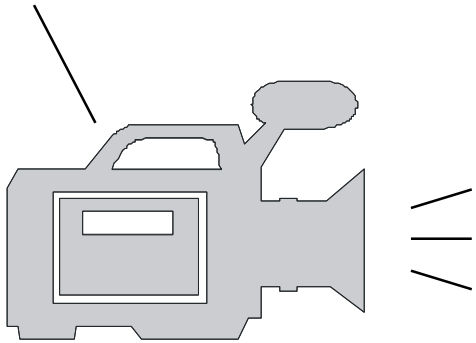
Oxygen transfer capacity in 250 mL shaking flasks

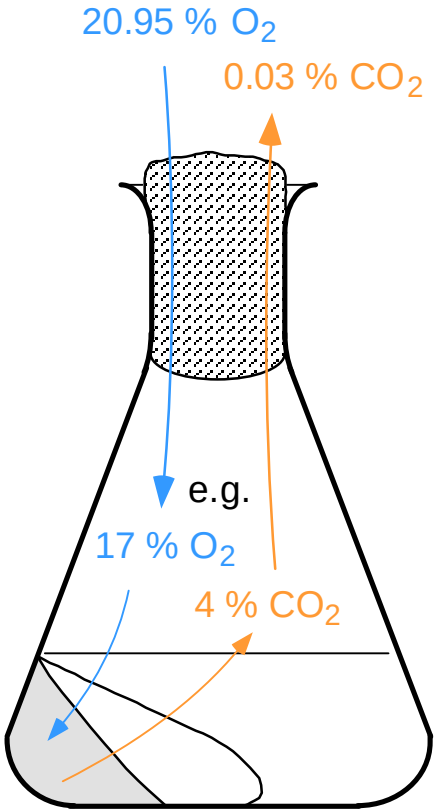


Optical determination of the oxygen transfer rate

$$OTR \sim \frac{\text{stoichiometric amount of sulphite}}{\text{time for oxidation}}$$

video camera



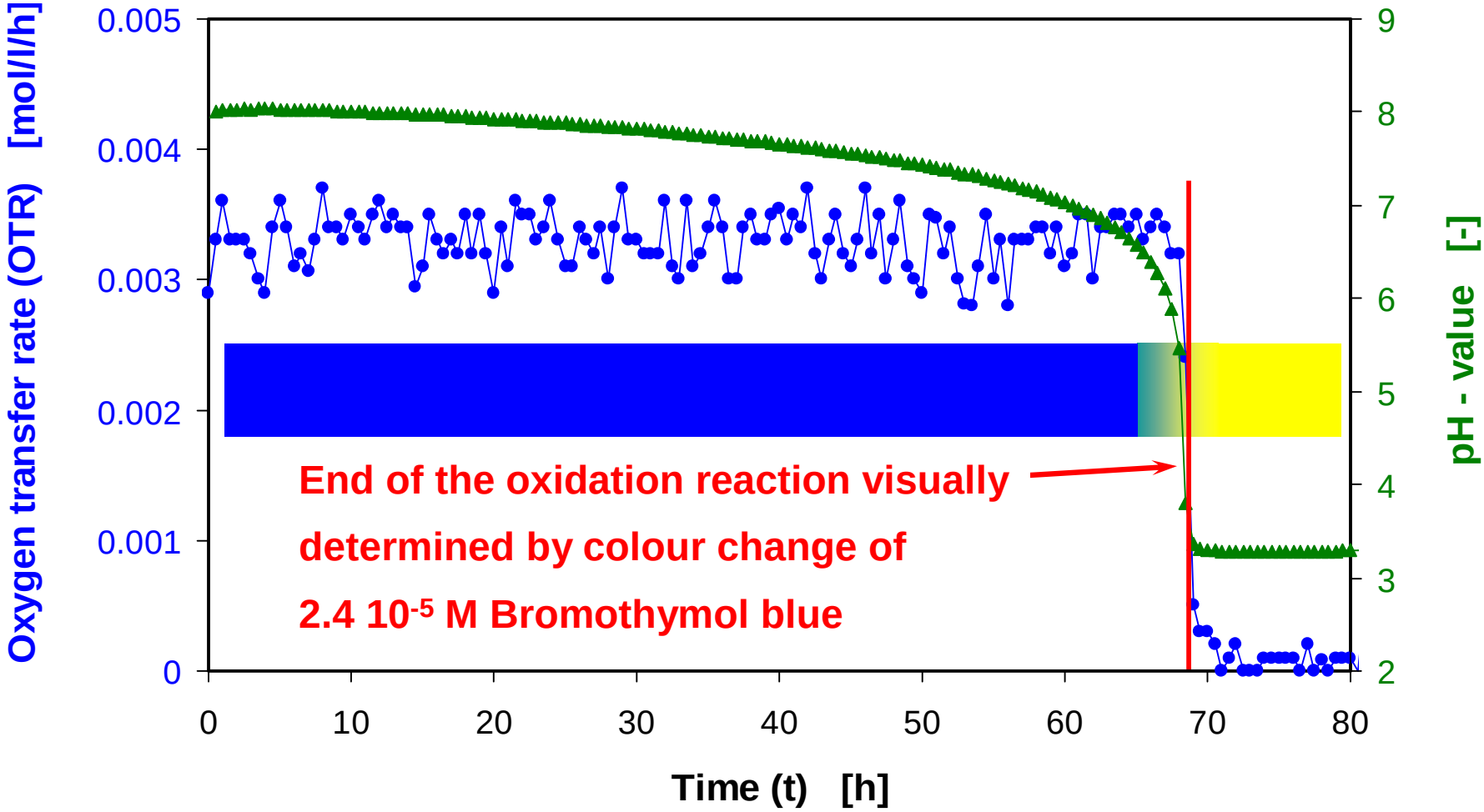


- gas/liquid mass transfer coefficient and
- mass transfer resistance of sterile barrier

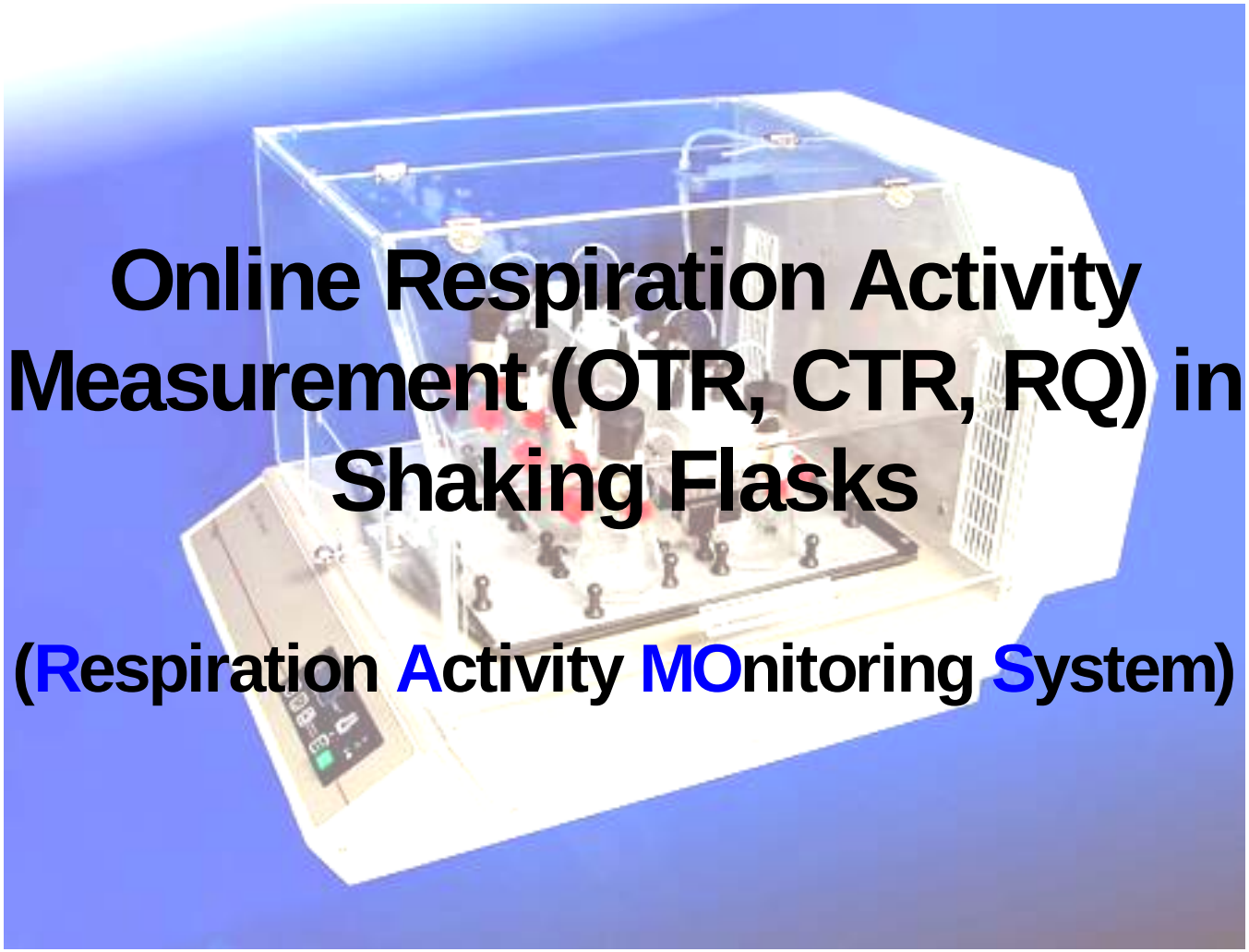
can be characterised

Optical determination of the oxygen transfer rate

$Na_2SO_3 + 0.5\ O_2 \Rightarrow Na_2SO_4$ 10^{-7} M $CoSO_4$ catalyst, 0.012 M phosphate buffered



Case study:

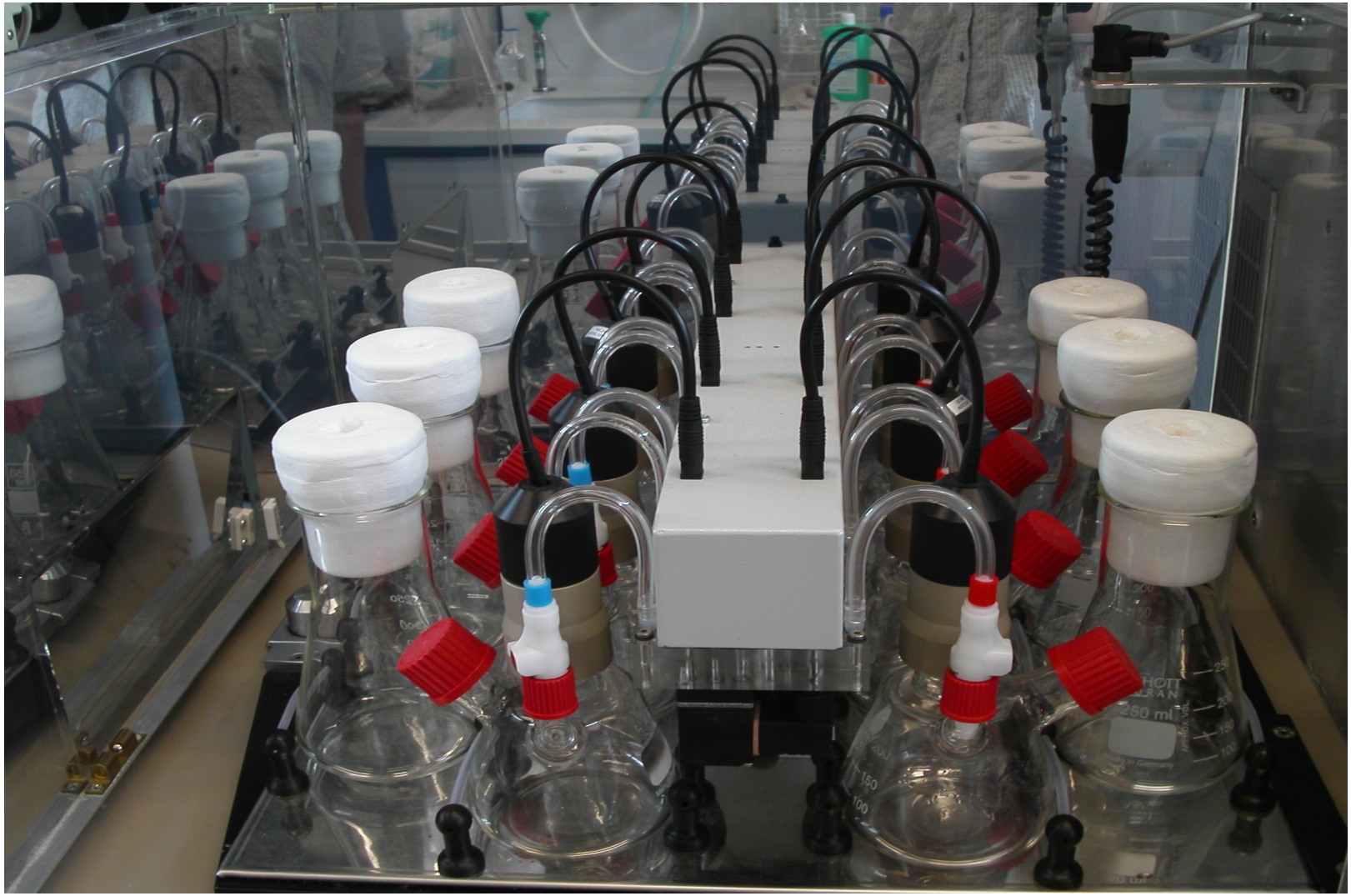


Online Respiration Activity Measurement (OTR, CTR, RQ) in Shaking Flasks

(Respiration Activity MOnitoring System)

Device for on-line measurement of O_2- and CO_2-transfer rate (OTR, CTR, RQ)

Respiration **A**ctivity **MO**nitoring **S**ystem (RAMOS)



Fields of application

- Online tracing of microbial cultures in shaking reactors (many details of the culture behaviour can be clarified at this very early stage of bio-process development).
- Easy determination of characteristic values for scale up (OTR, CTR, RQ, μ_{max}, $k_L a$...).
- Recognition and prevention of oxygen and substrate limiting, product inhibition.
- Identification of changes in metabolism (e.g. diauxic growth)
- Recognition of suitable conditions for conventional mass screening (operating duration, media, operating conditions).
- Media optimisation, reduction of media developing time.
- Fermentation balancing.
- Verification of molecular biological approaches.
- Process optimisation
- Quality control.
- Scale up

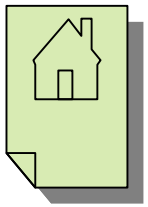
با روشهاي معمول فعلي SSB مقايسه

- مقايسه كمي اين تكنيك در مورد صرفه‌جويي در هزينه‌ها و زمان نسبت به فرآيندهاي مرسوم (Lab Bioreactors) كه از كارهاي تجربي محققين استخراج شده است در زير آمده است

صرفه‌جويي در ماده اوليه	صرفه‌جويي در زمان عملكرد	صرفه‌جويي در زمان بهينه‌سازي
%٨٧	%٣٤	%٧٥

میکرو ارگانیسمها صنعتي و سلول های کیاهی و جانوری استفاده شده در SSB

- *Bacillus spez.*
- *Botrytis cinerea*
- *Catharanthus roseus*
- Corynebacterium glutamicum
- Escherichia coli
- *Gluconobacter oxidans*
- Hansenula polymorpha
- Hybridoma Cells
- *Lactobacillus kefir*
- Nicotiana tabacum
- *Pichia pastoris*
- Pichia stipitis
- Pseudomonas fluorescens
- *Pseudoalteromonas haloplanctis*
- Pseudomonas pudita
- Saccharomyces cerevisiae
- *Streptomyces lividans*
- *Vibrio natregiens*
- *Xanthomonas campestris*



Motivation

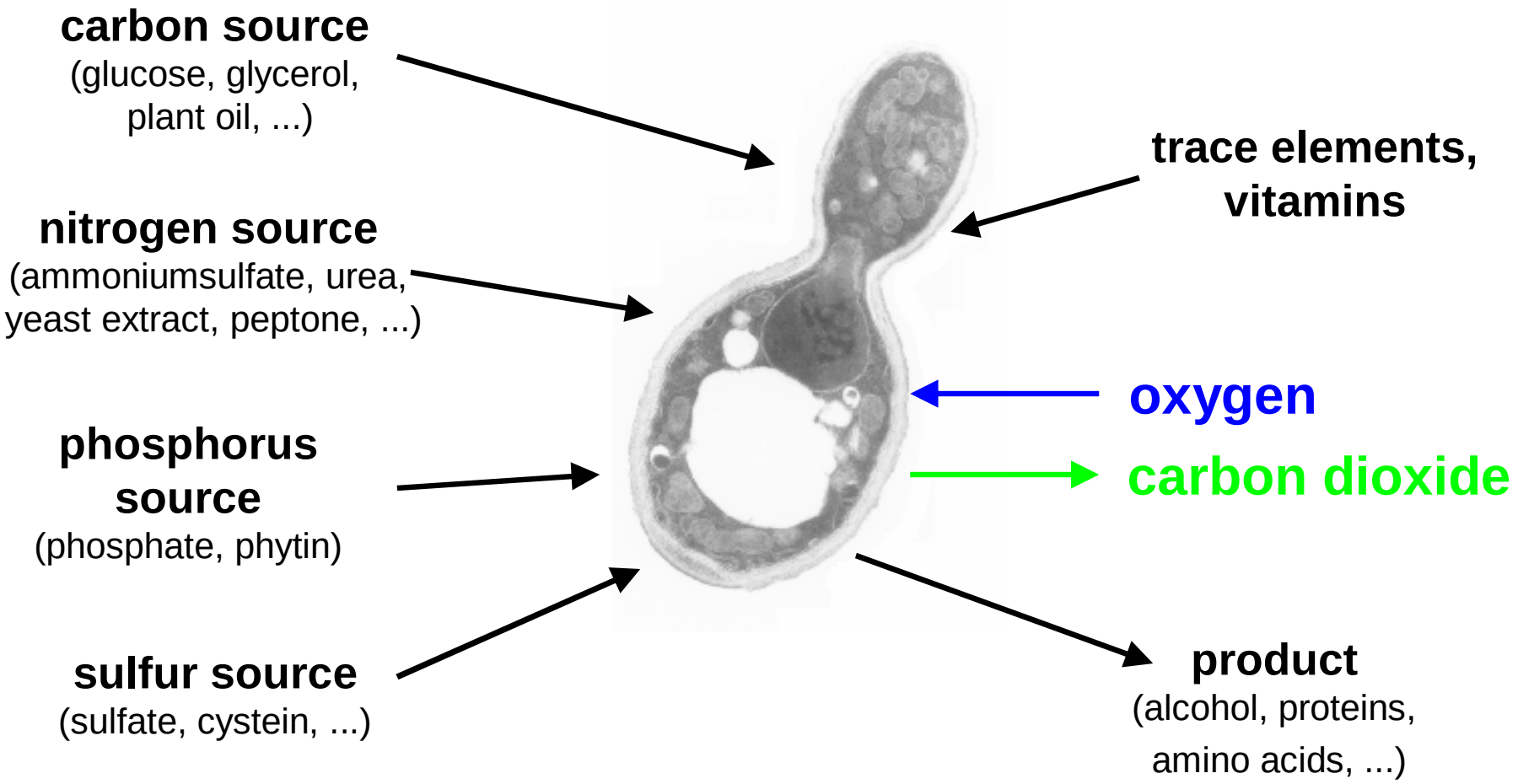
“The disadvantage of the shake flask as an experimental system is that the experimenter has only limitied capabilitities for on-line monitoring and control”

Payne et al., 1990

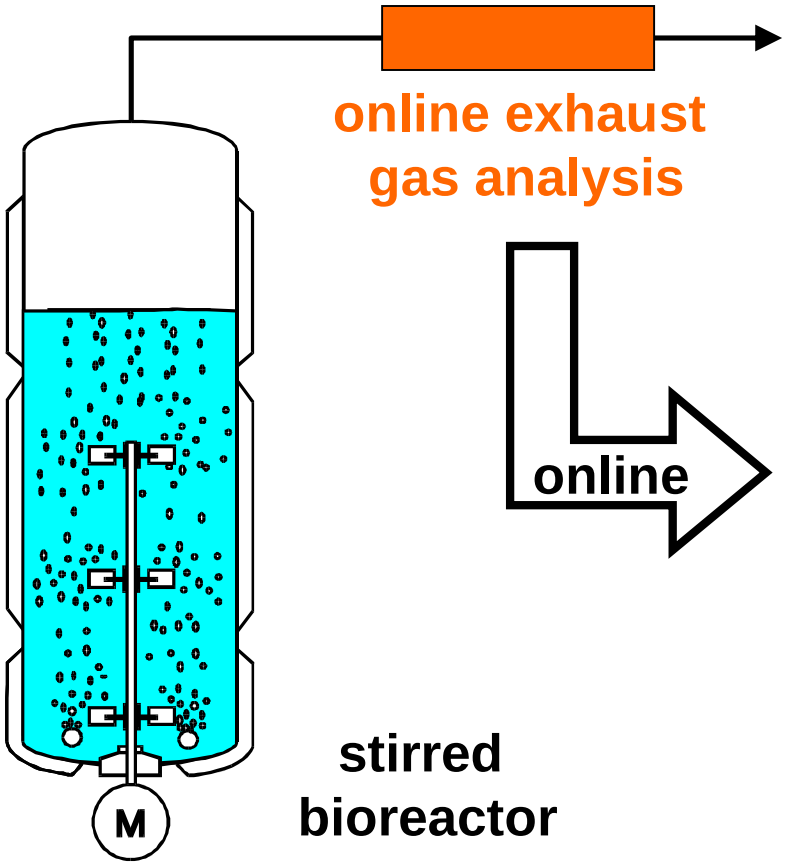
“Weakness of small-scale liquid fermentations: discontinuous monitoring”

Hilton, 1999

What kind of online measurement signal?



State of the Art

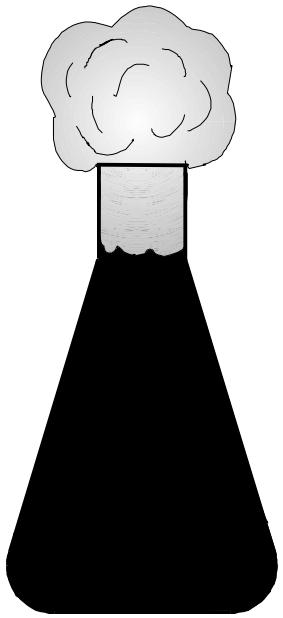


OTR

CTR

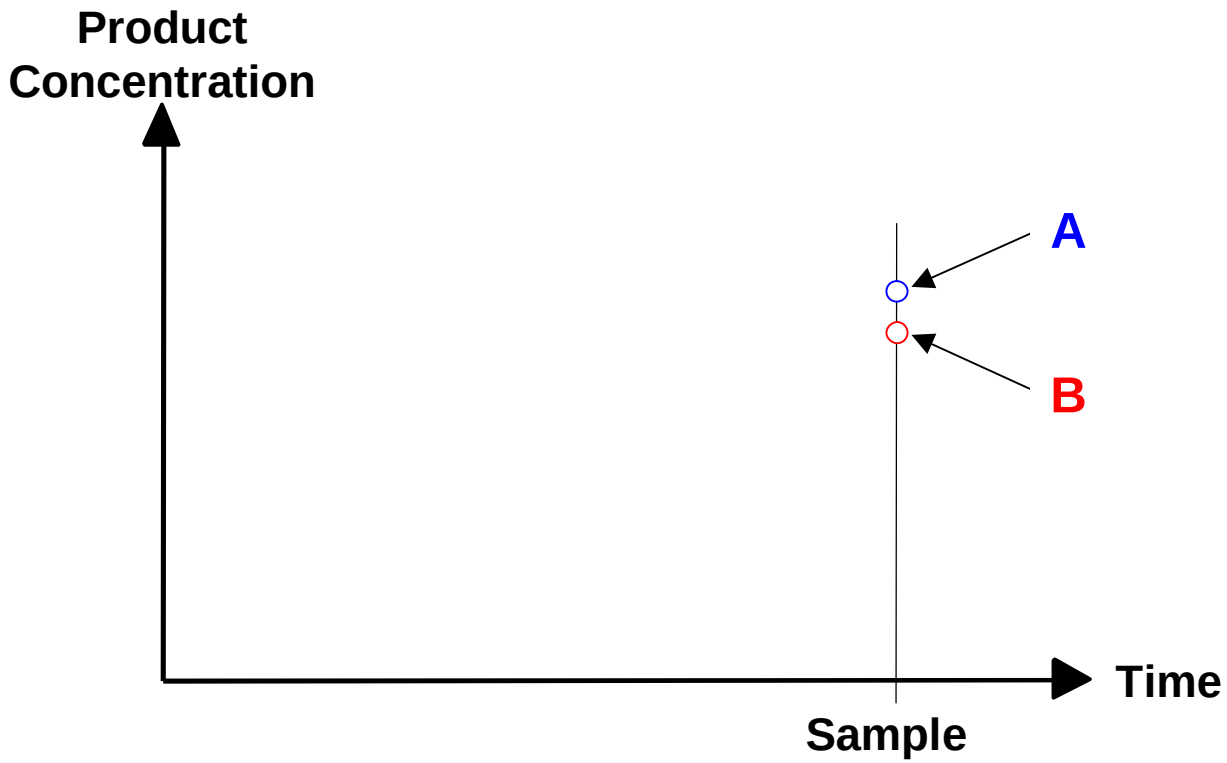
RQ

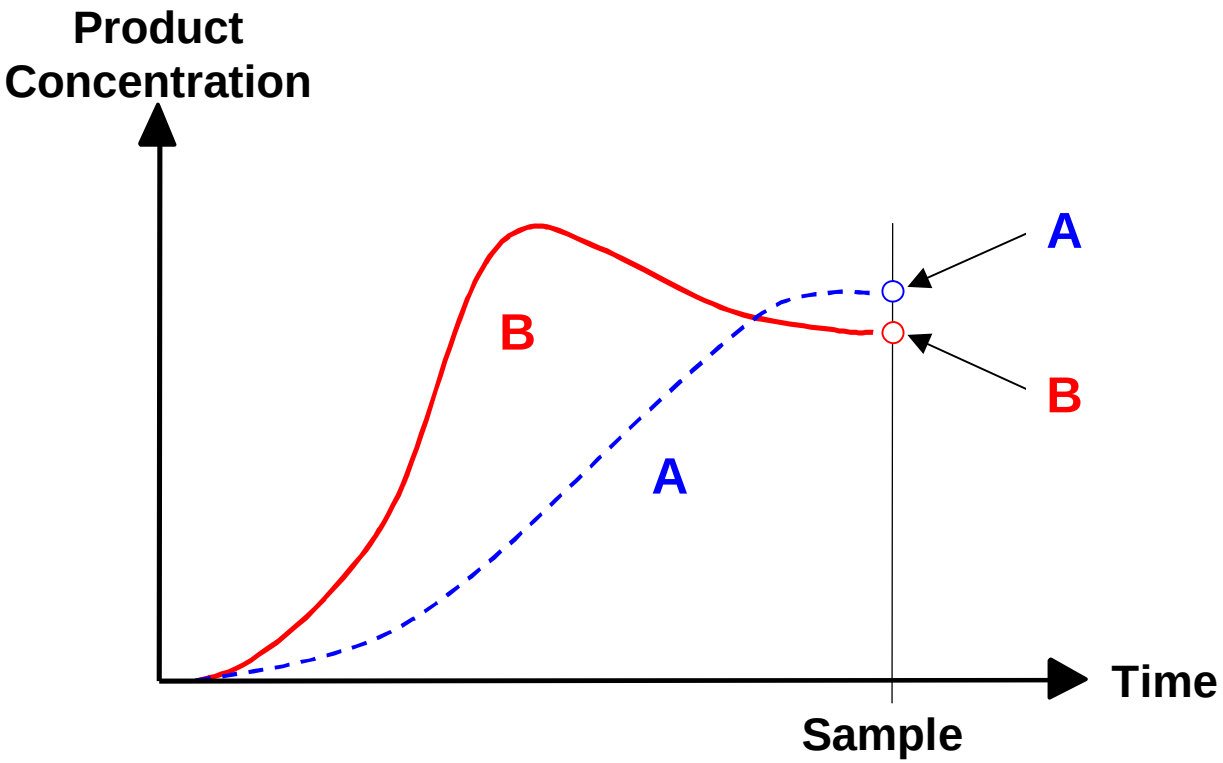
stirred
bioreactor



shaking
bioreactor

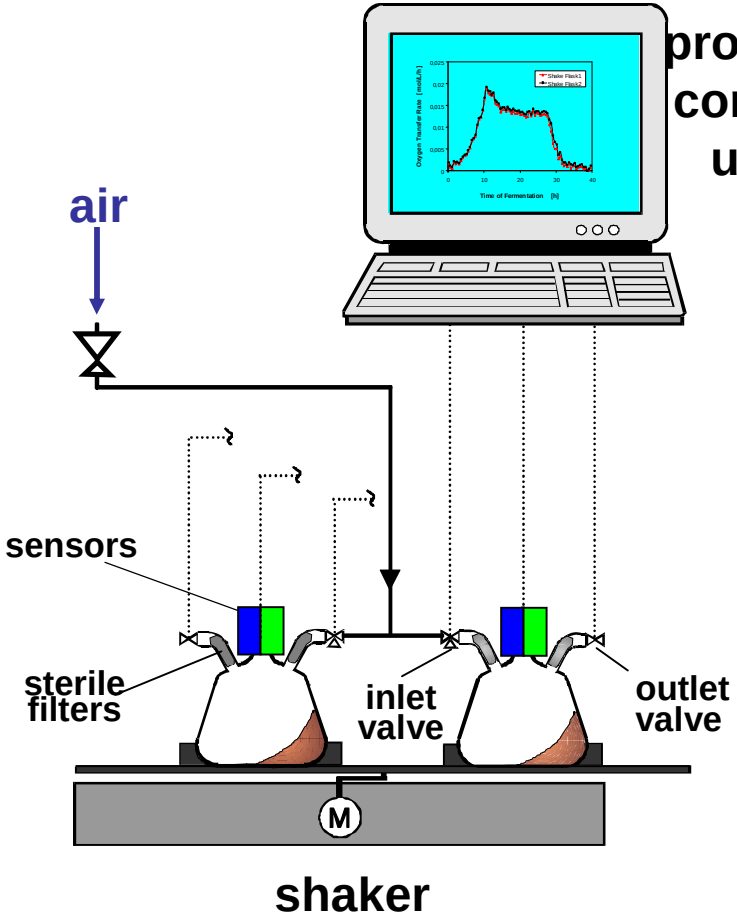
We do not know the course of the fermentation!

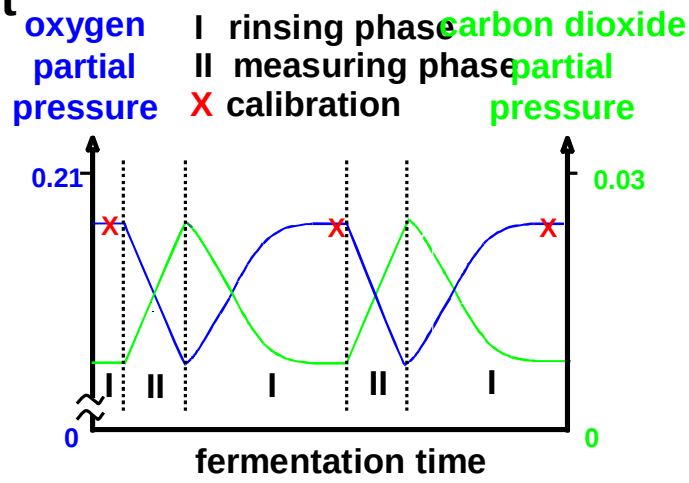



Product
Concentration
A
B
B
A
Time
Sample

Solution

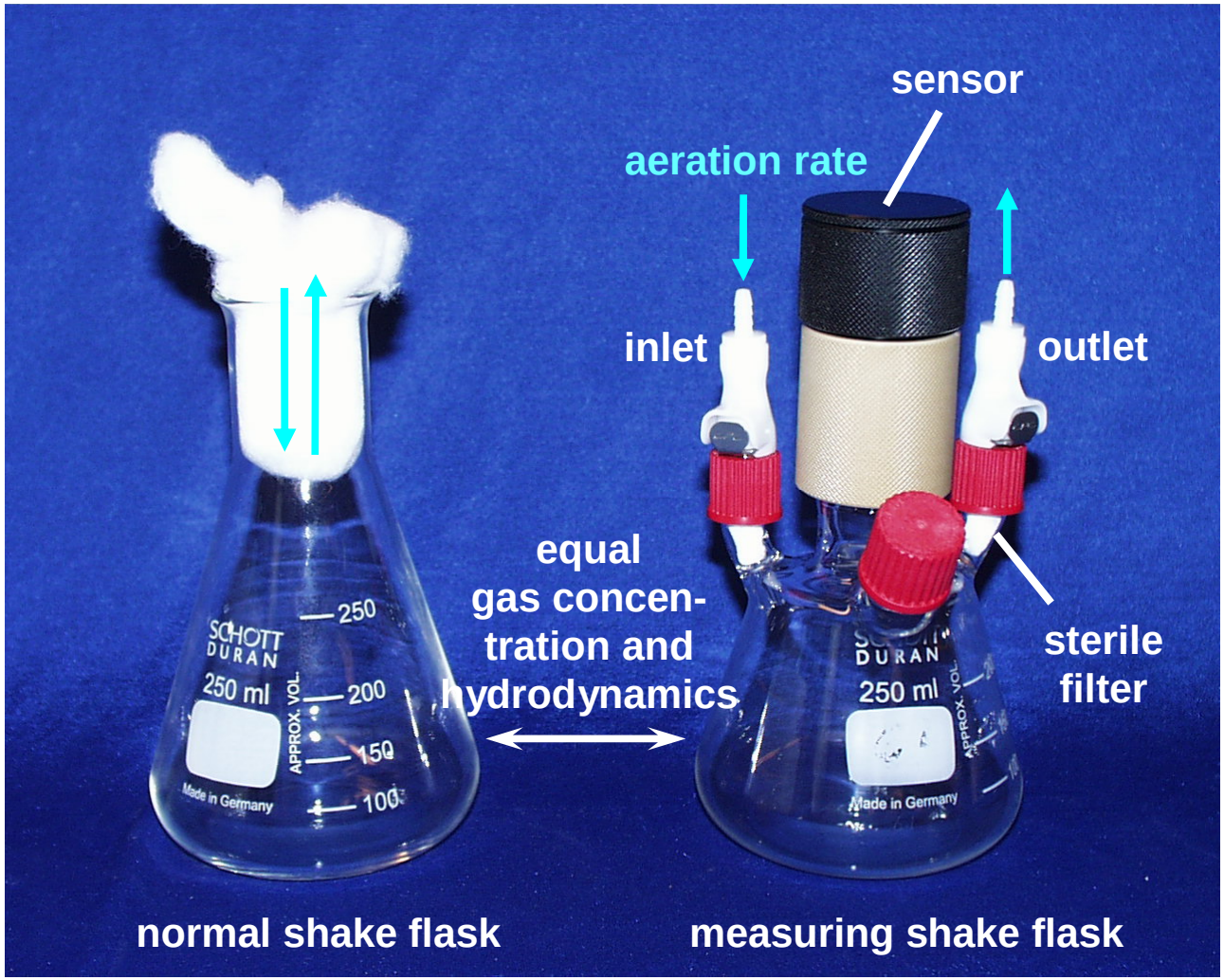
RAMOS measures online the respiration activities (OTR, CTR, RQ) of biological systems under sterile conditions in shaking flasks



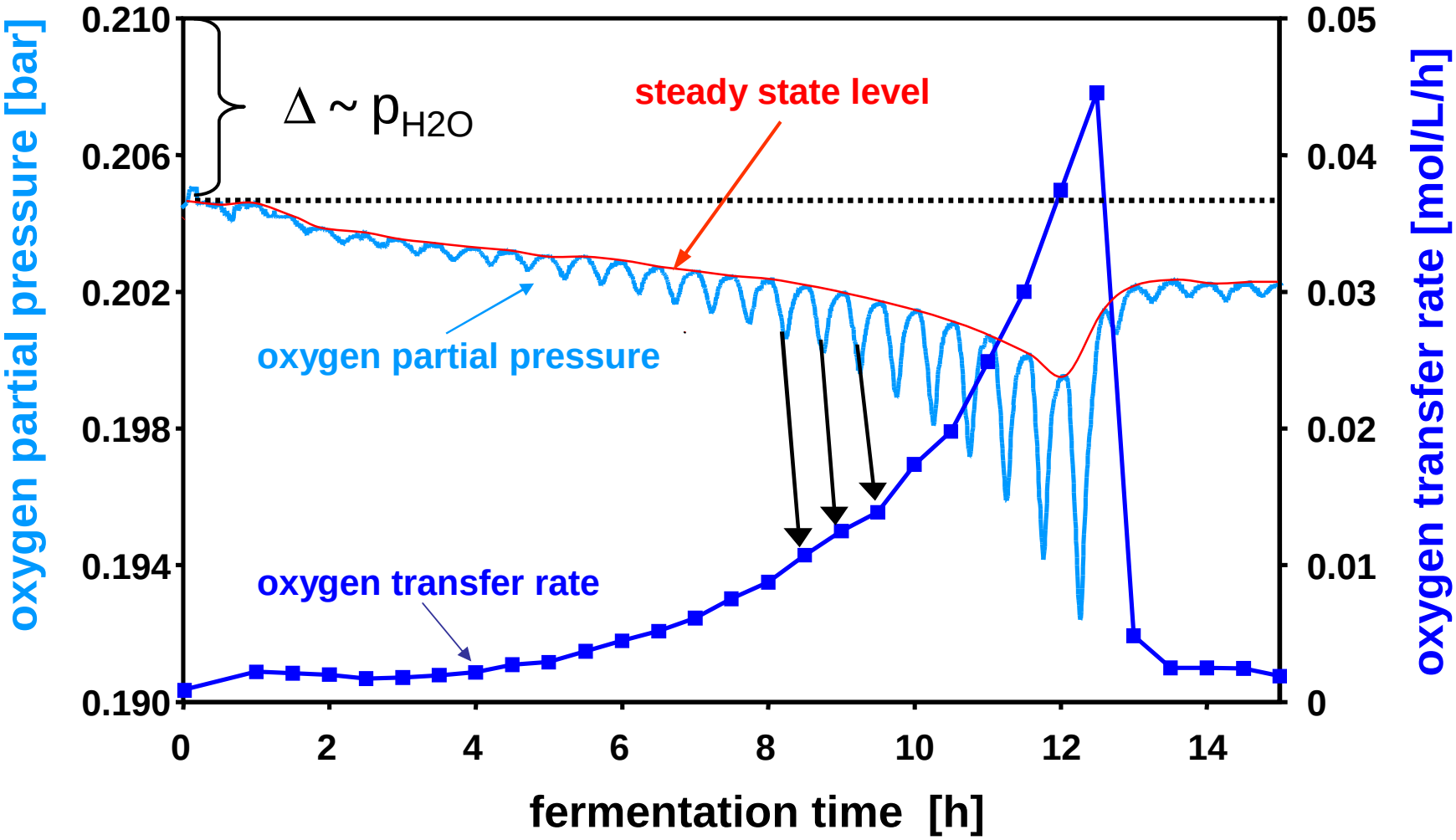


$$OTR = \frac{n_{O2}}{V_l \times t} = \frac{\Delta p_{O2}}{\Delta t} \times \frac{V_g}{R \times T \times V_l} \left[\frac{mol}{L \times h}\right]$$

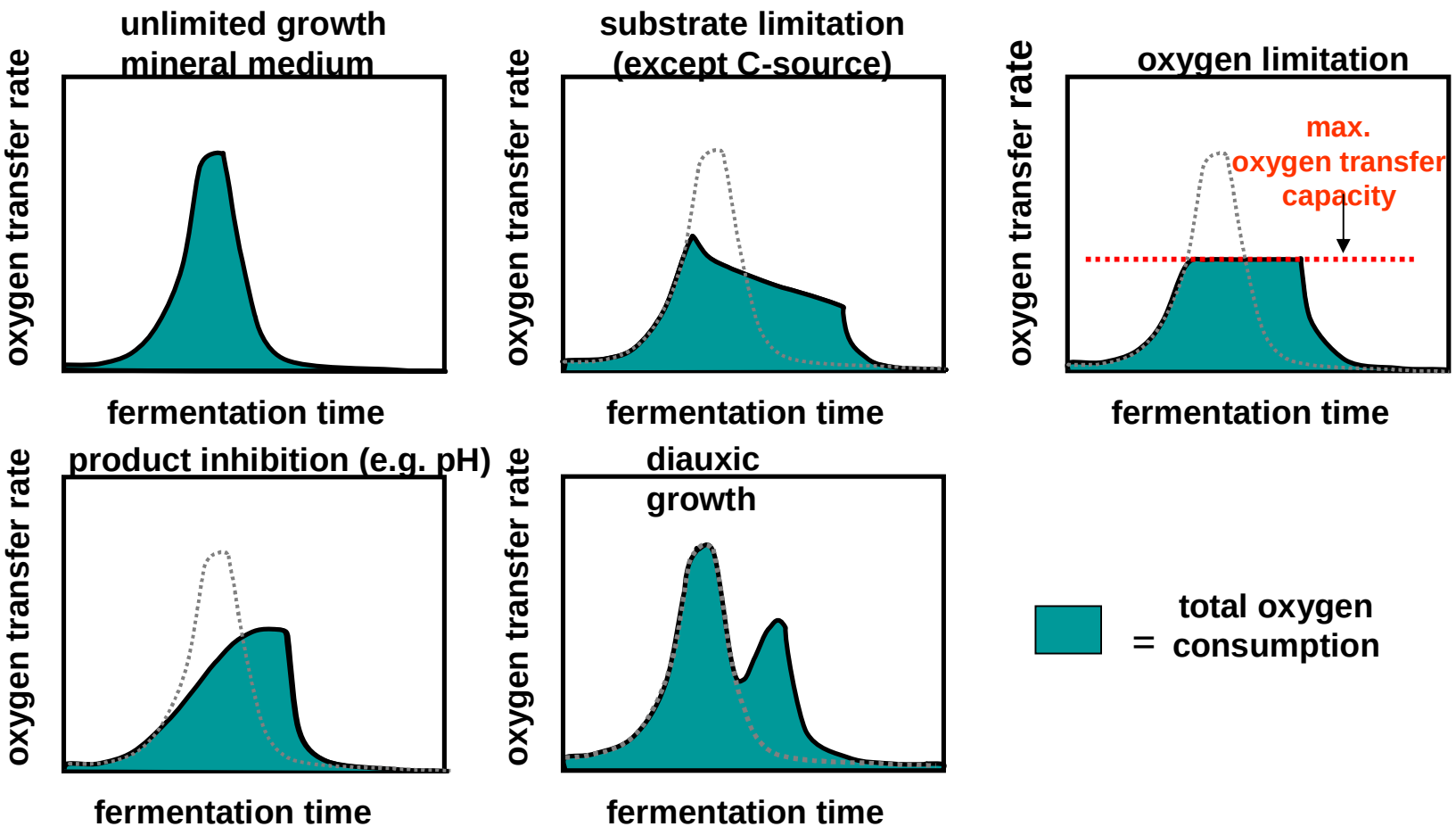
$$CTR = \frac{n_{CO2}}{V_l \times t} = \frac{\Delta p_{CO2}}{\Delta t} \times \frac{V_g}{R \times T \times V_l} \left[\frac{mol}{L \times h}\right]$$


sensor
aeration rate
inlet
outlet
equal
gas concen-
tration and
hydrodynamics
sterile
filter
SCHOTT
DURAN
250 ml
APPROX. VOL.
250
200
150
100
Made in Germany
DURAN
250 ml
APPROX. VOL.
Made in Germany
normal shake flask
measuring shake flask

Development of the OTR-course

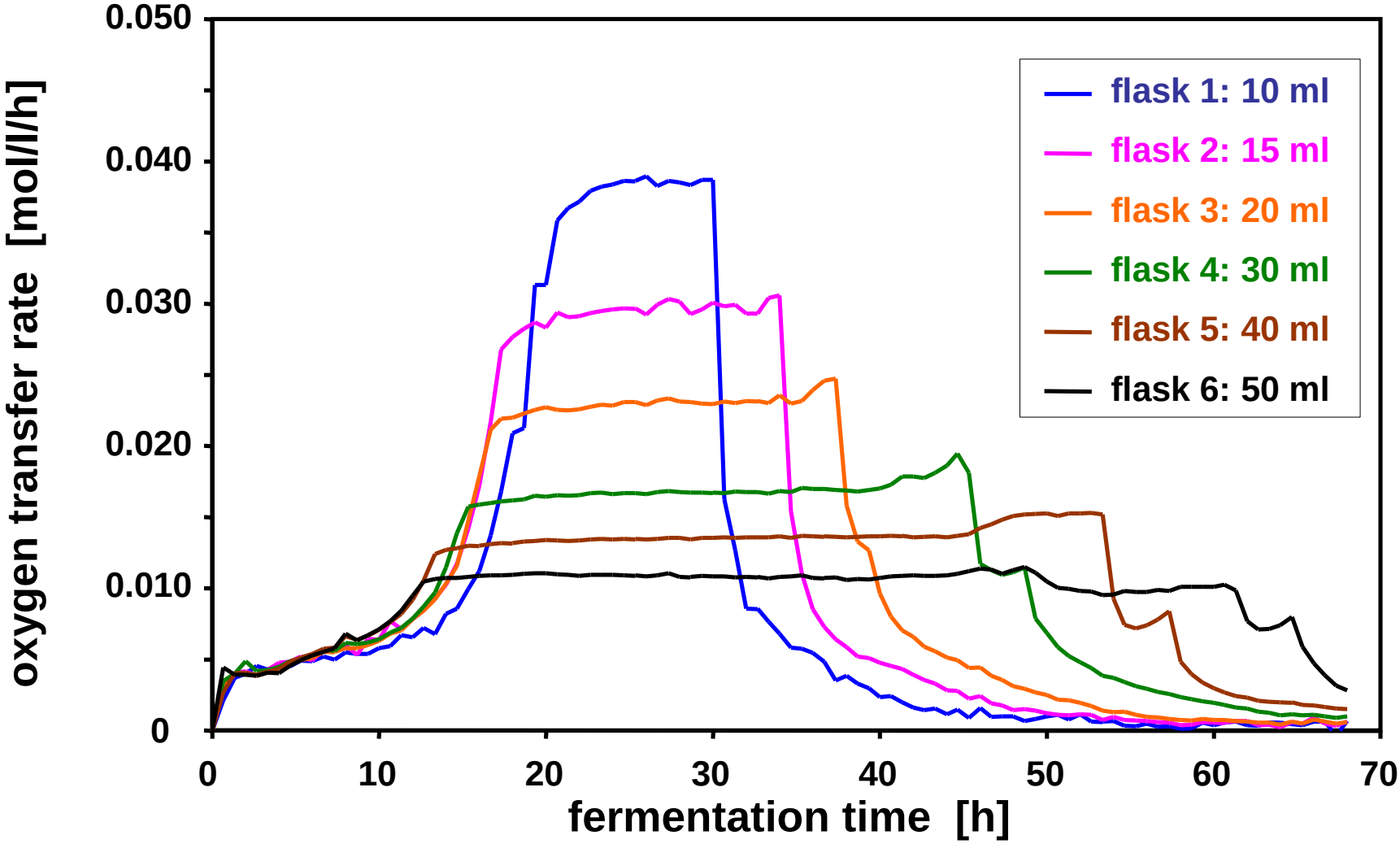


Selection of typical biological phenomena



Corynebacterium glutamicum

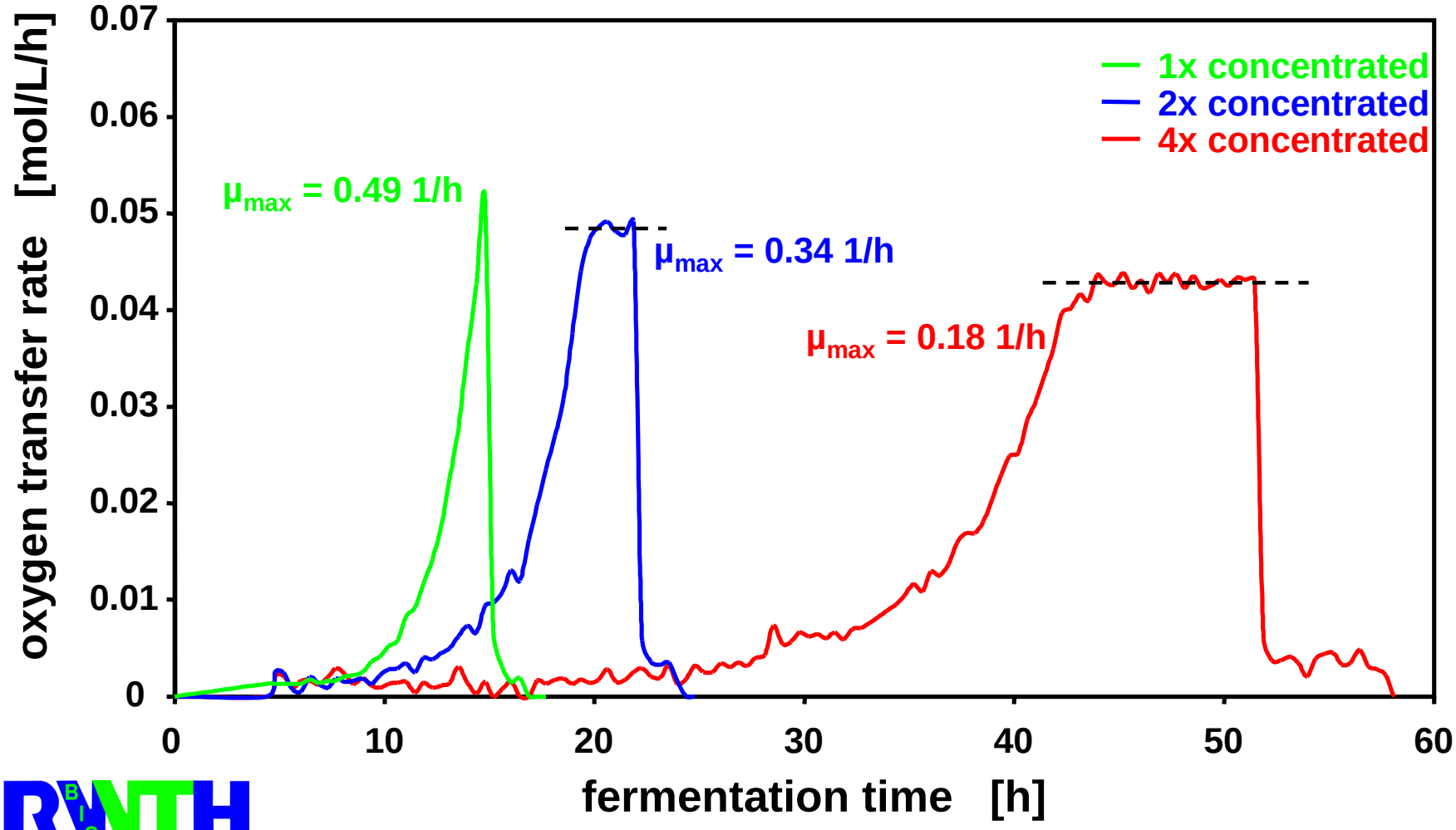
30°C, mineral medium, 30 g/L glucose , with $CaCO_3$
shaking frequency 200 rpm, shaking diameter 50mm



Media optimisation

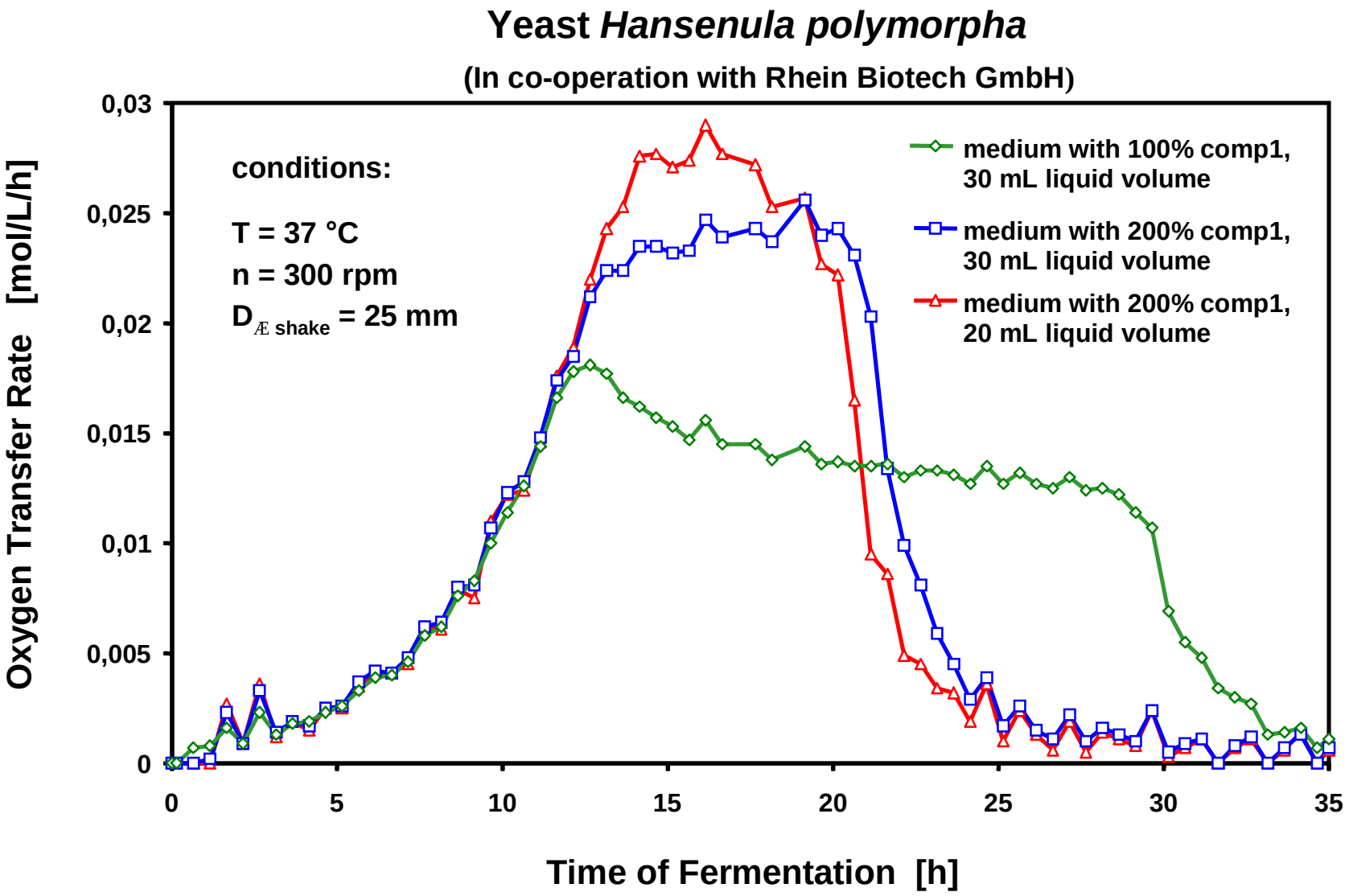
Pseudomonas fluorescens

30°C, glucose 30g/L, complex medium
shaking frequency 200 rpm, shaking diameter 25mm,
filling volume 10mL



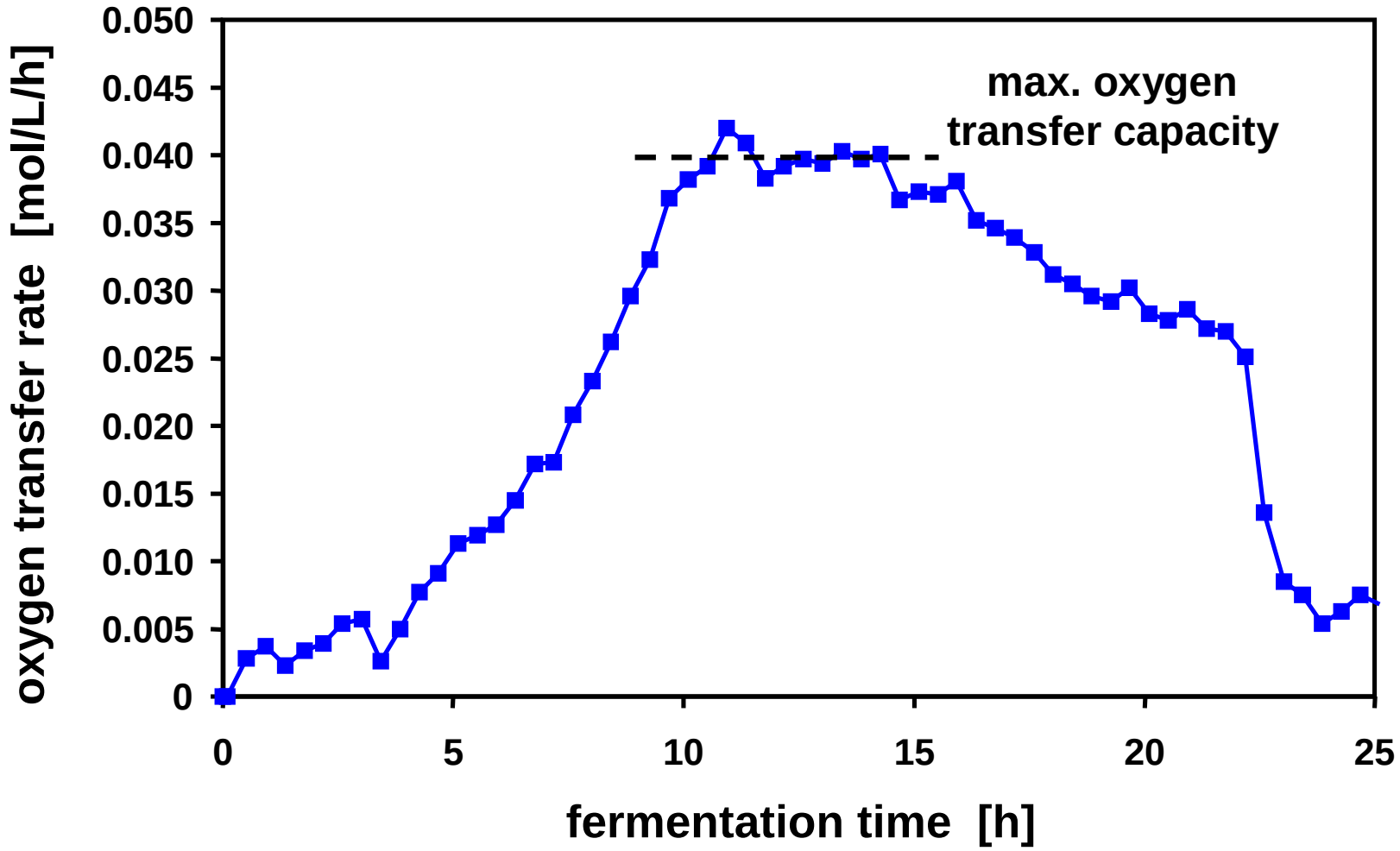
BIOVERFAHRENSTECHNIK AACHEN

Media and process optimisation



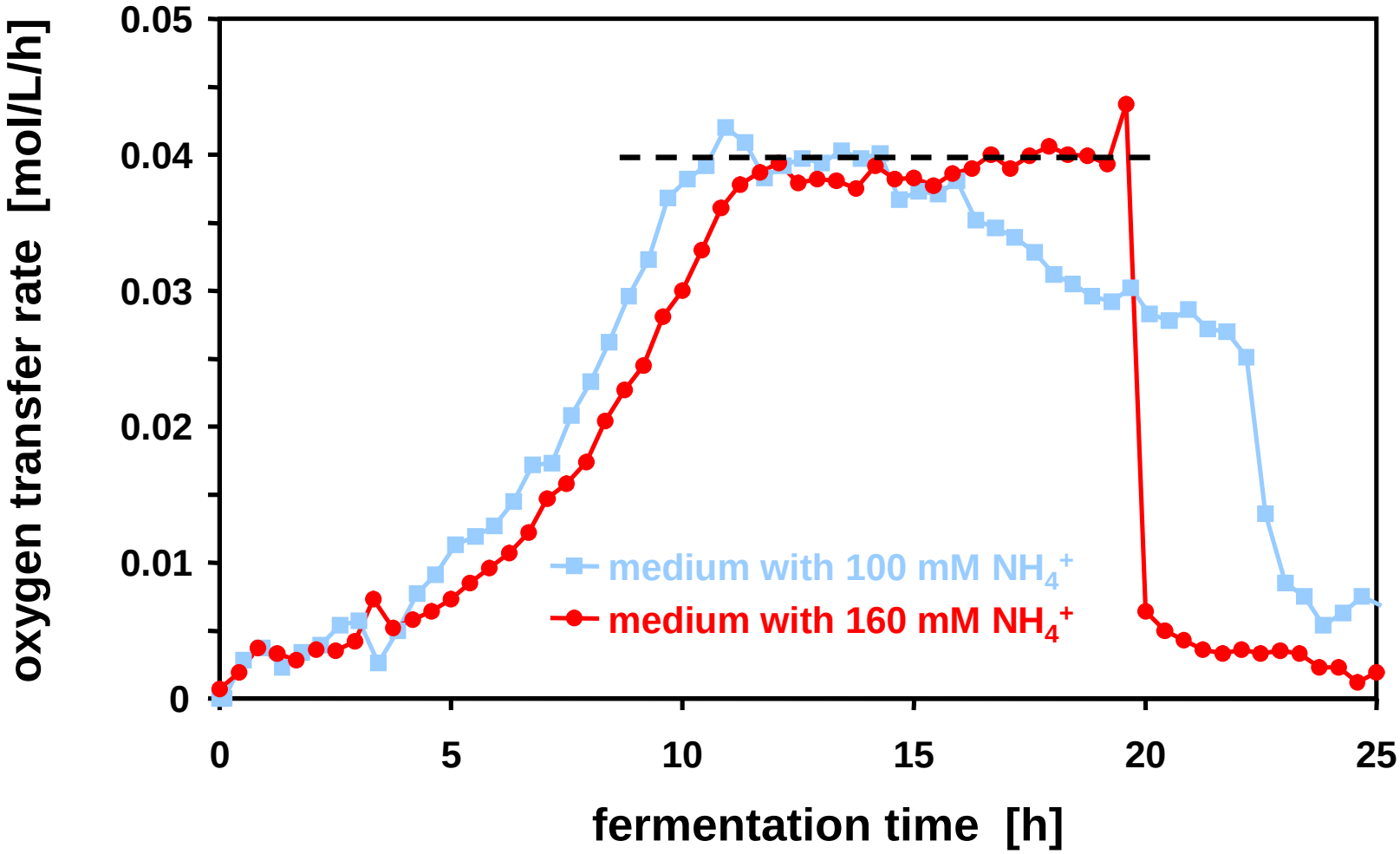
Pseudomonas putida

30°C, 30g/L glucose, mineral medium, shaking frequency 250 rpm, shaking diameter 50mm, filling volume 10mL



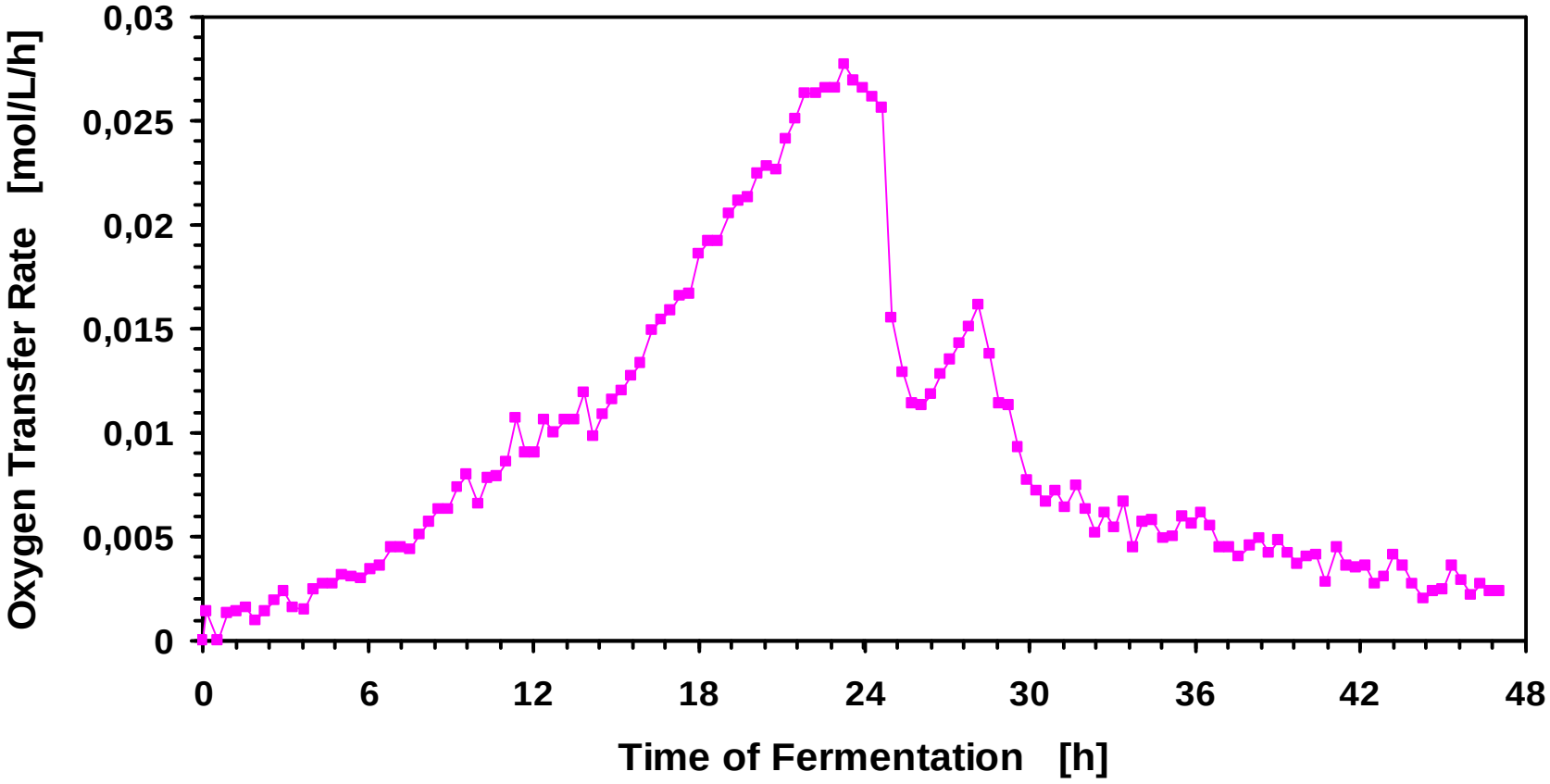
Pseudomonas putida

30°C, 30g/L glucose, mineral medium, shaking frequency 250 rpm, shaking diameter 50mm, filling volume 10mL



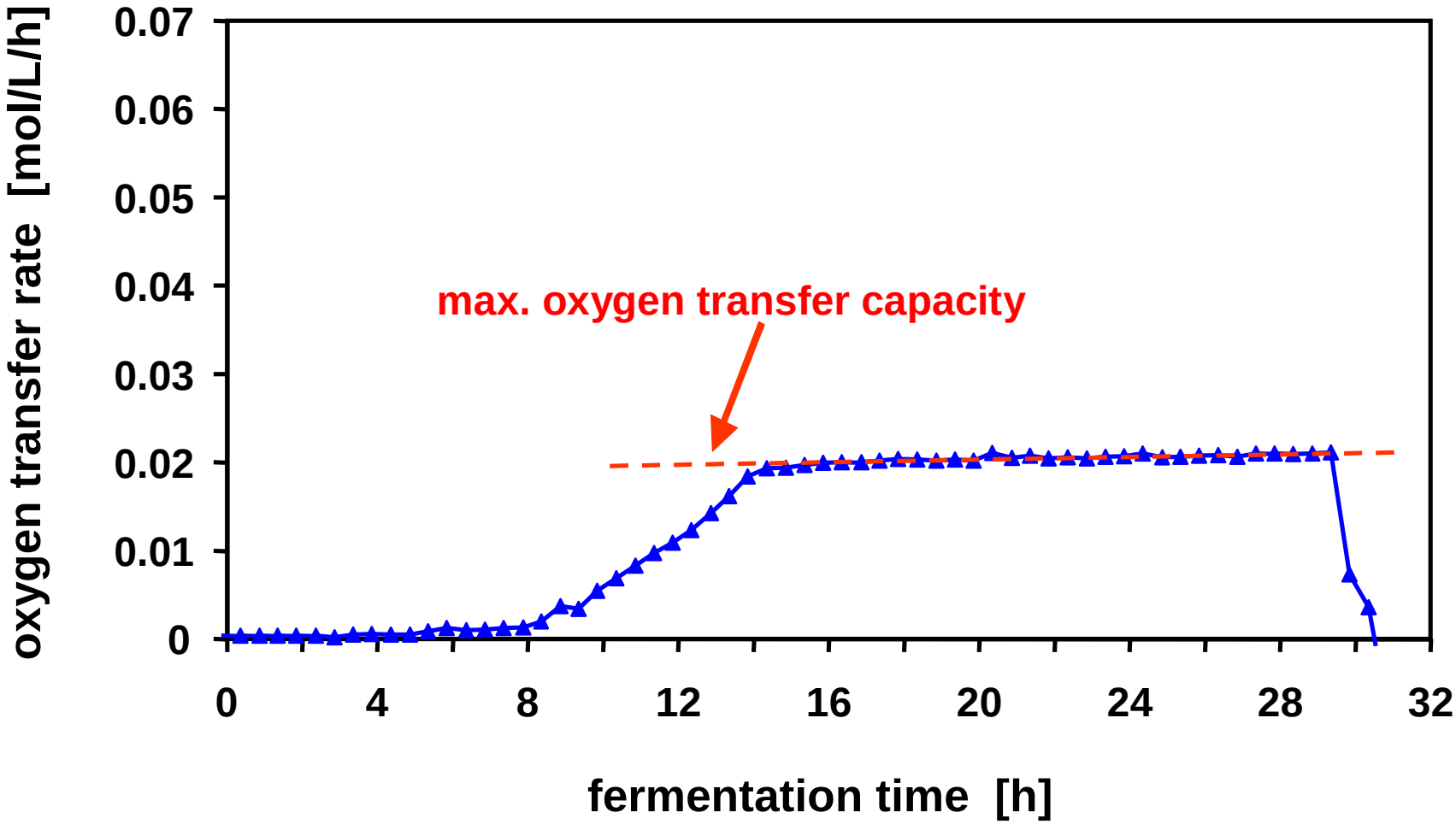
Bacteria *Rhodococcus spec.*

(Measurements carried out at the BASF AG)



Saccharomyces cerevisiae

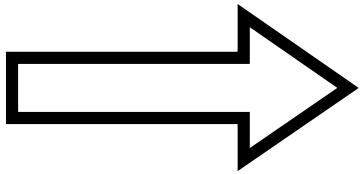
30°C, 20g/L glucose, complex medium, shaking frequency 200 rpm, shaking diameter 50mm, filling volume 25mL



oxygen transfer rate

+

carbon dioxide transfer rate

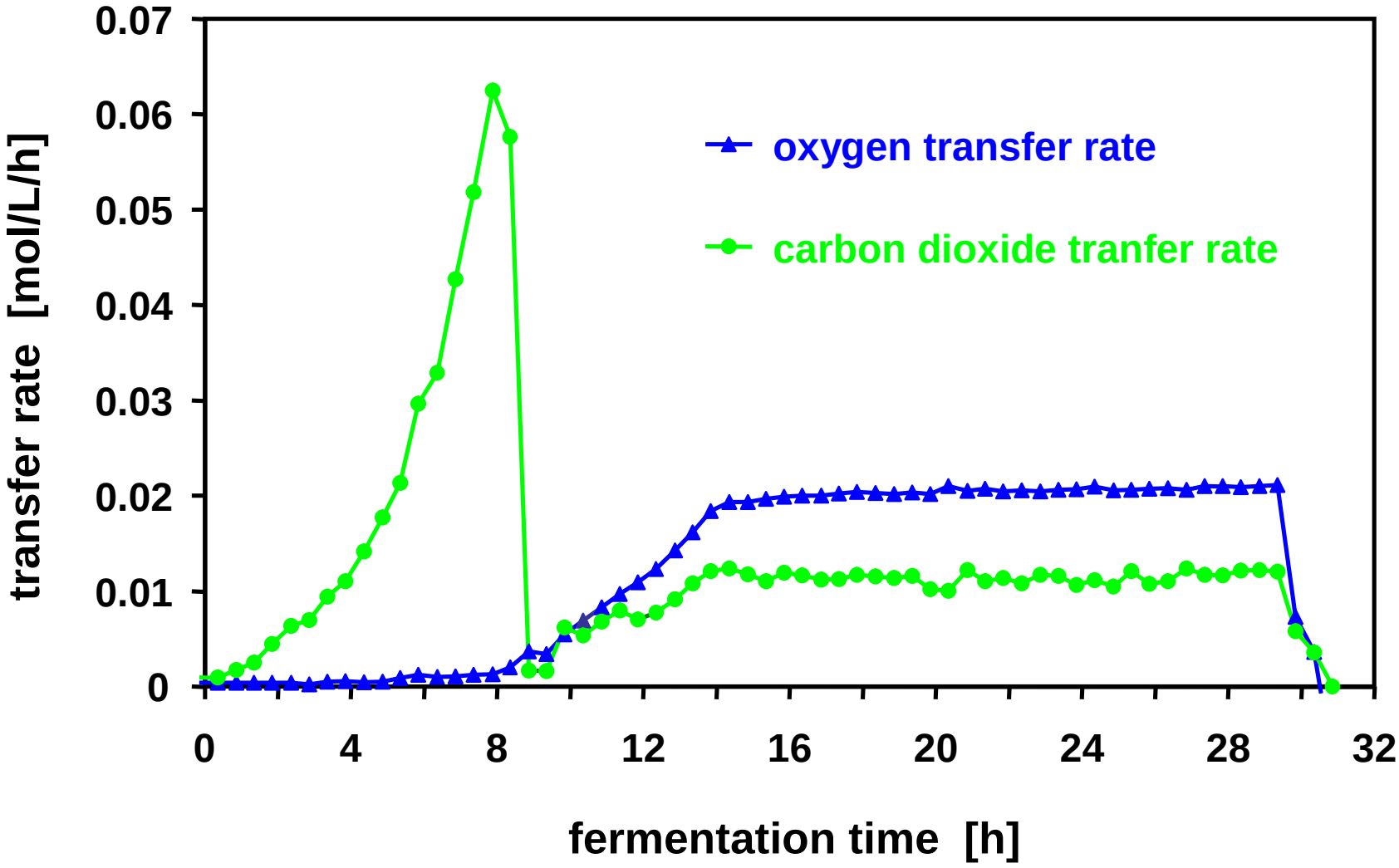


more information

Crabtree effect

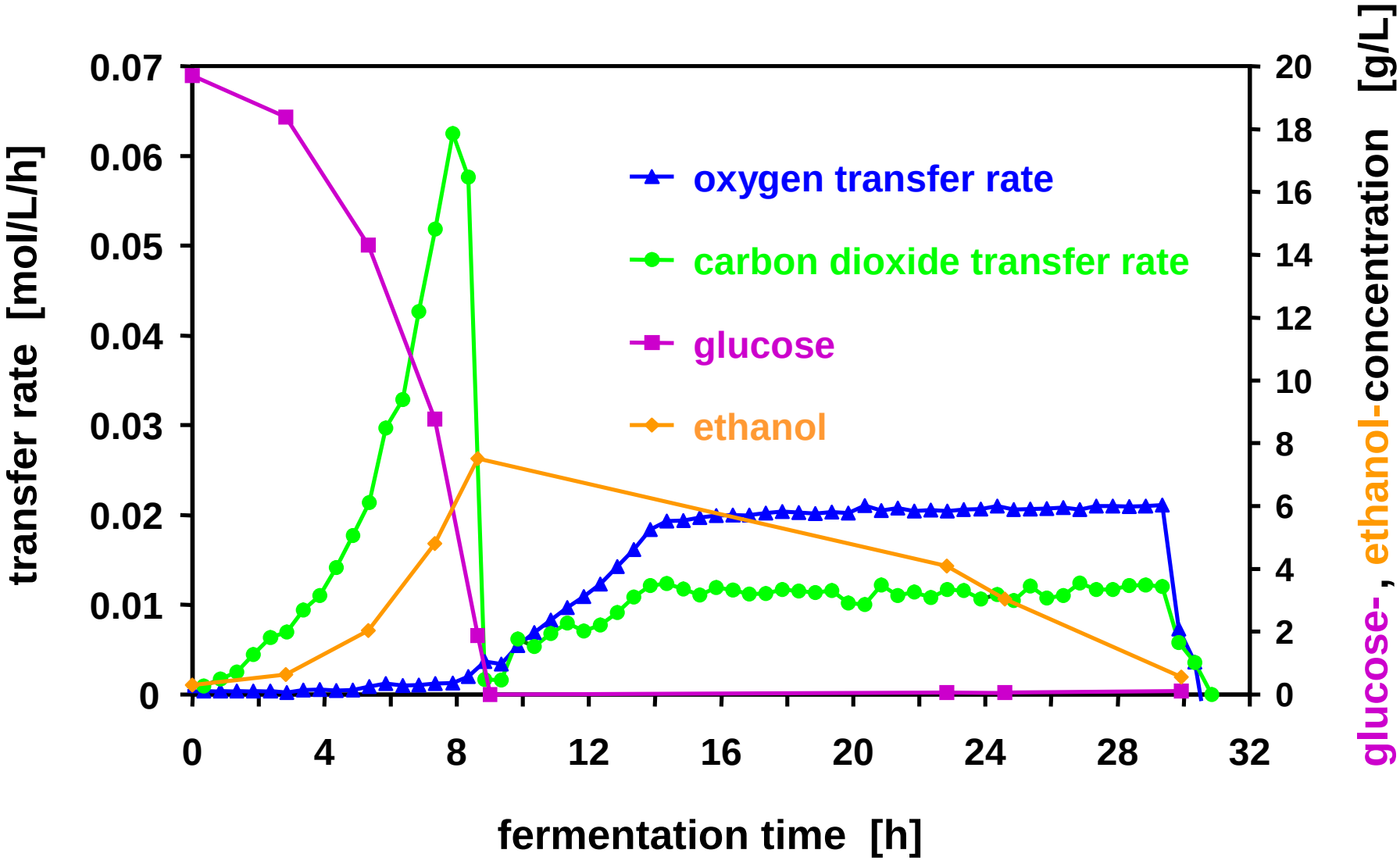
Saccharomyces cerevisiae

30°C, 20g/L glucose, complex medium, shaking frequency 200 rpm, shaking diameter 50mm, filling volume 25mL

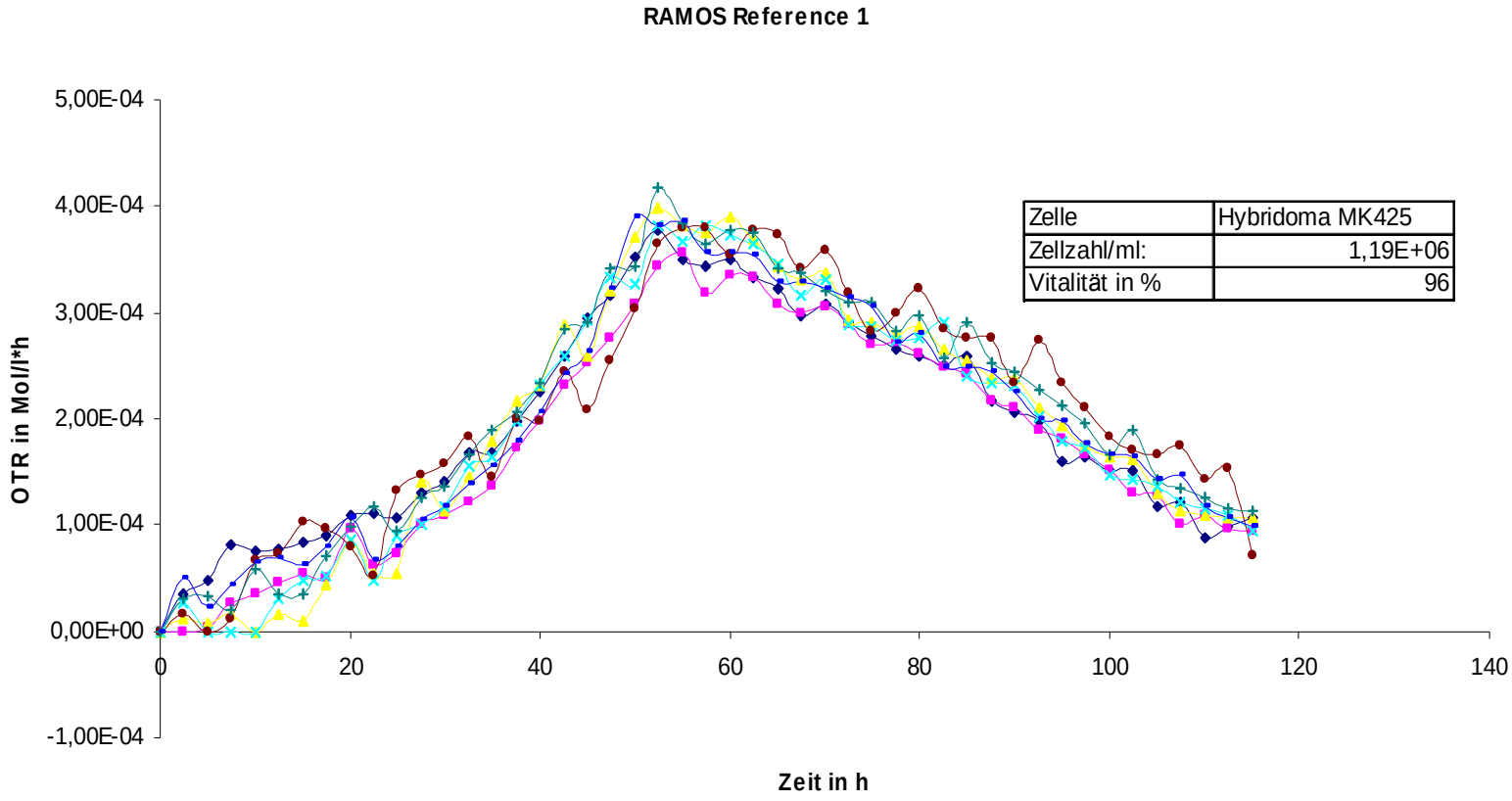


Saccharomyces cerevisiae

30°C, 20g/L glucose, complex medium, shaking frequency 200 rpm, shaking diameter 50mm, filling volume 25mL

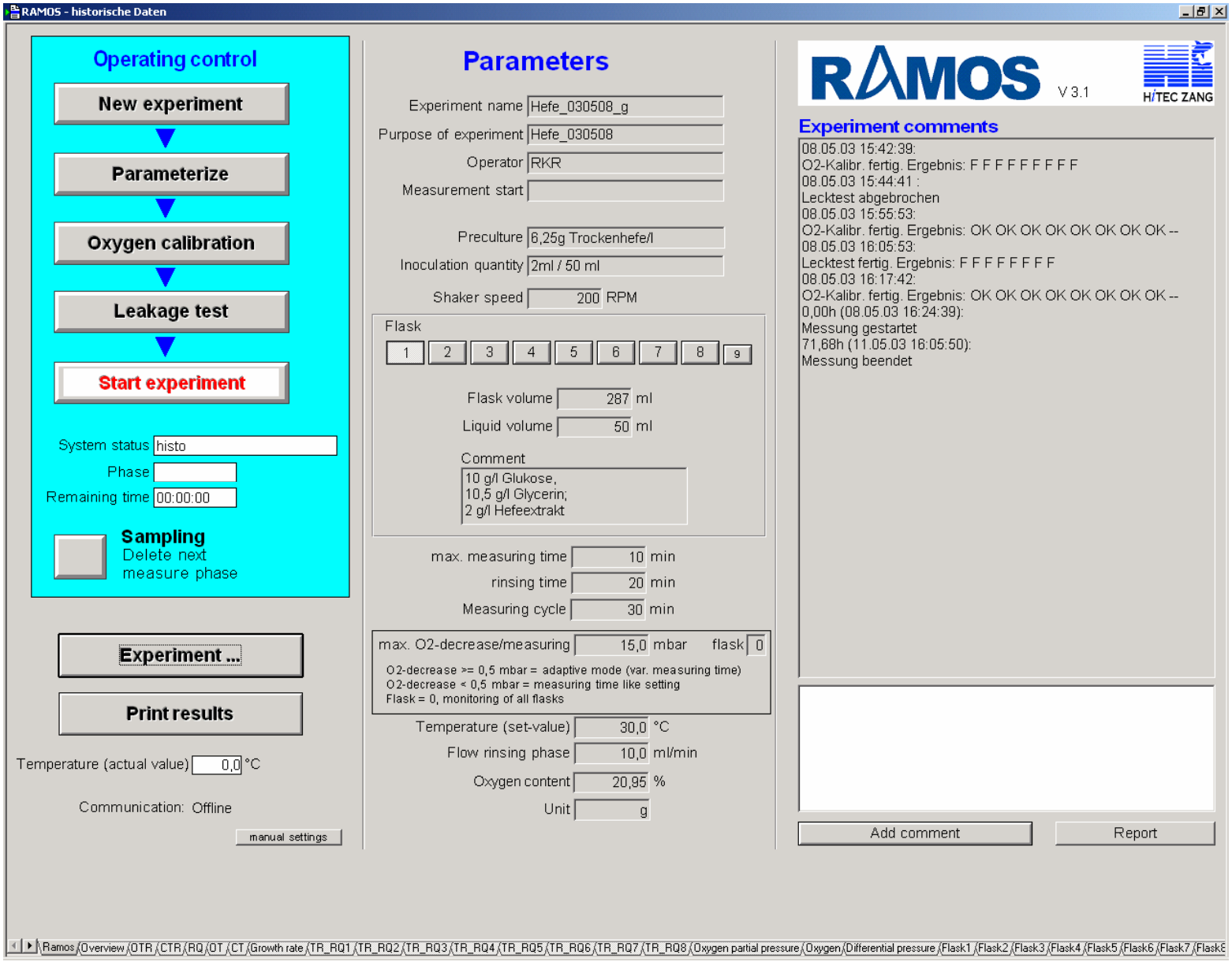


RAMOS Cell culture



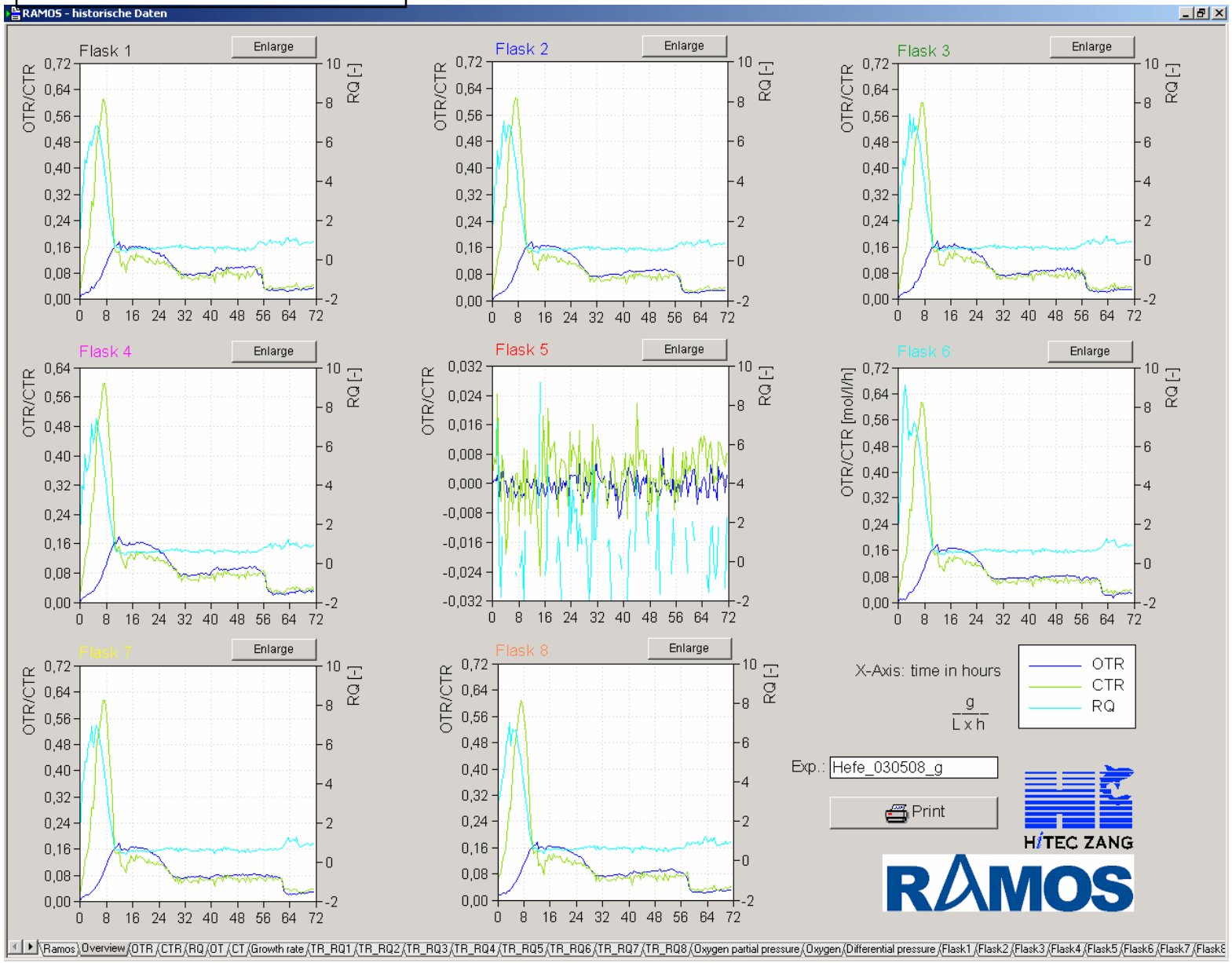
RAMOS

Control program



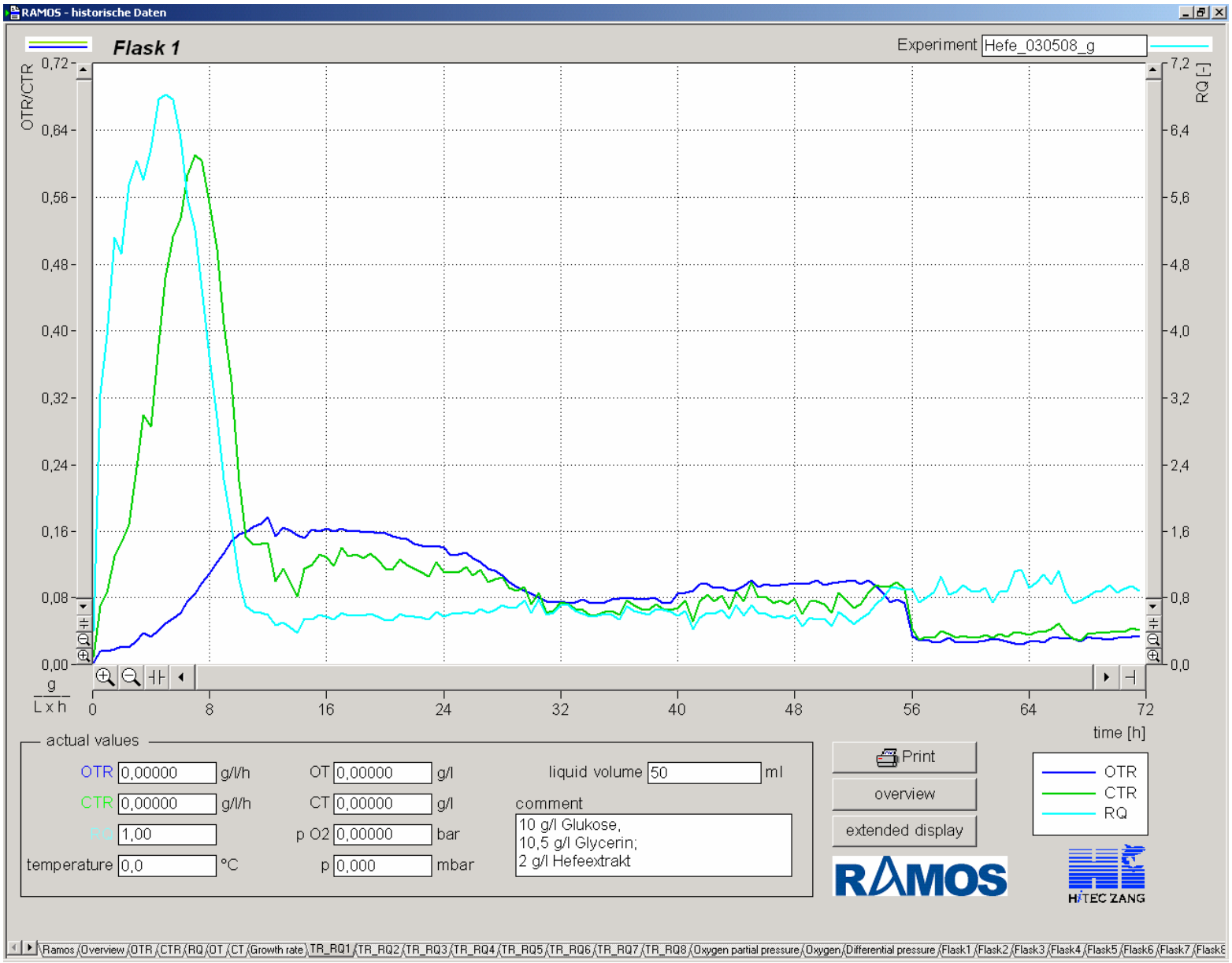
RAMOS

Overview



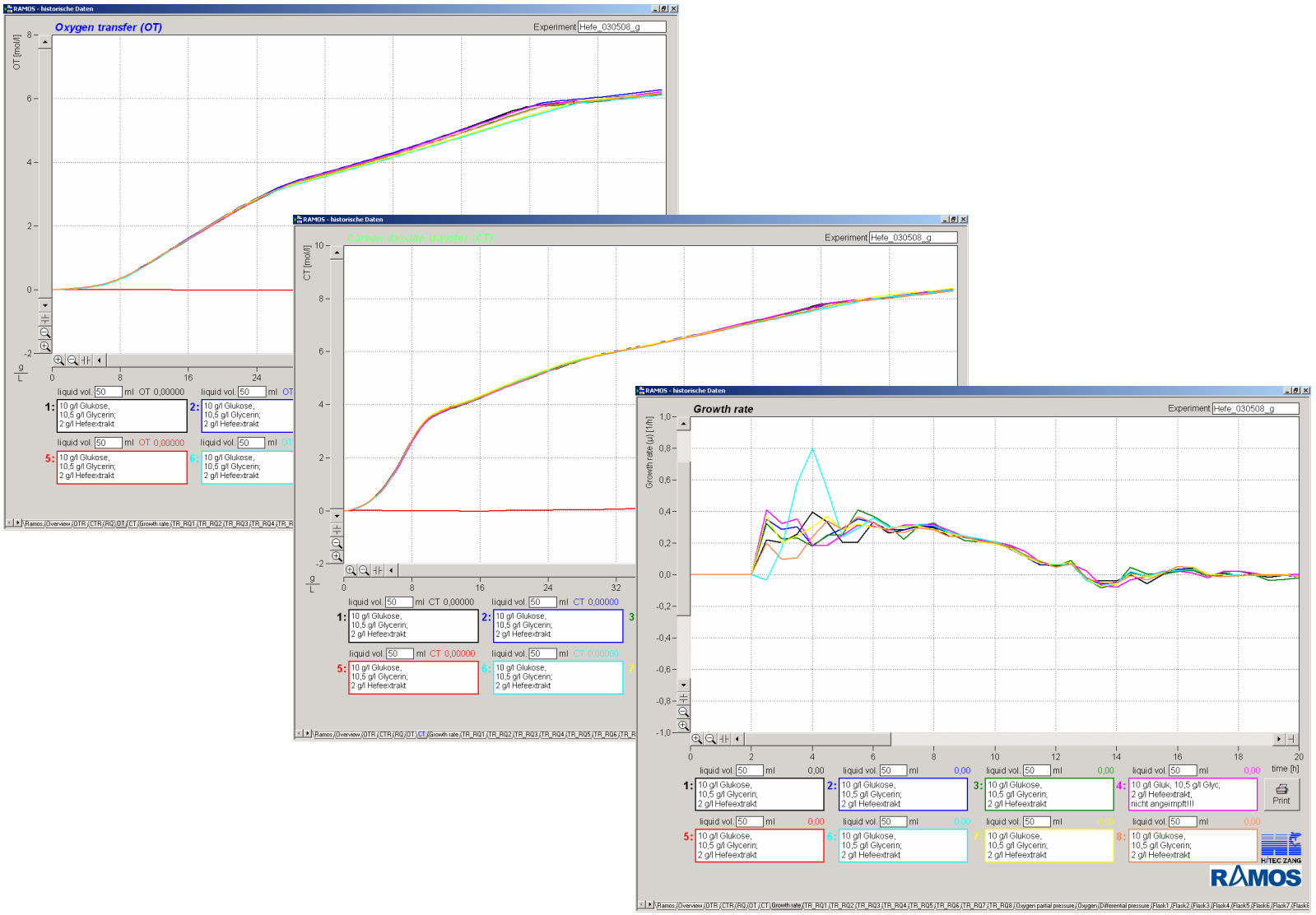
RAMOS

Single flask (OTR / CTR / RQ)



RAMOS

OT / CT / growth rate



Case Study:
The Oxygen Transfer Rate as the Key Parameter for the Characterisation and Optimisation of *Hansenula polymorpha* Screening Cultures

Contents

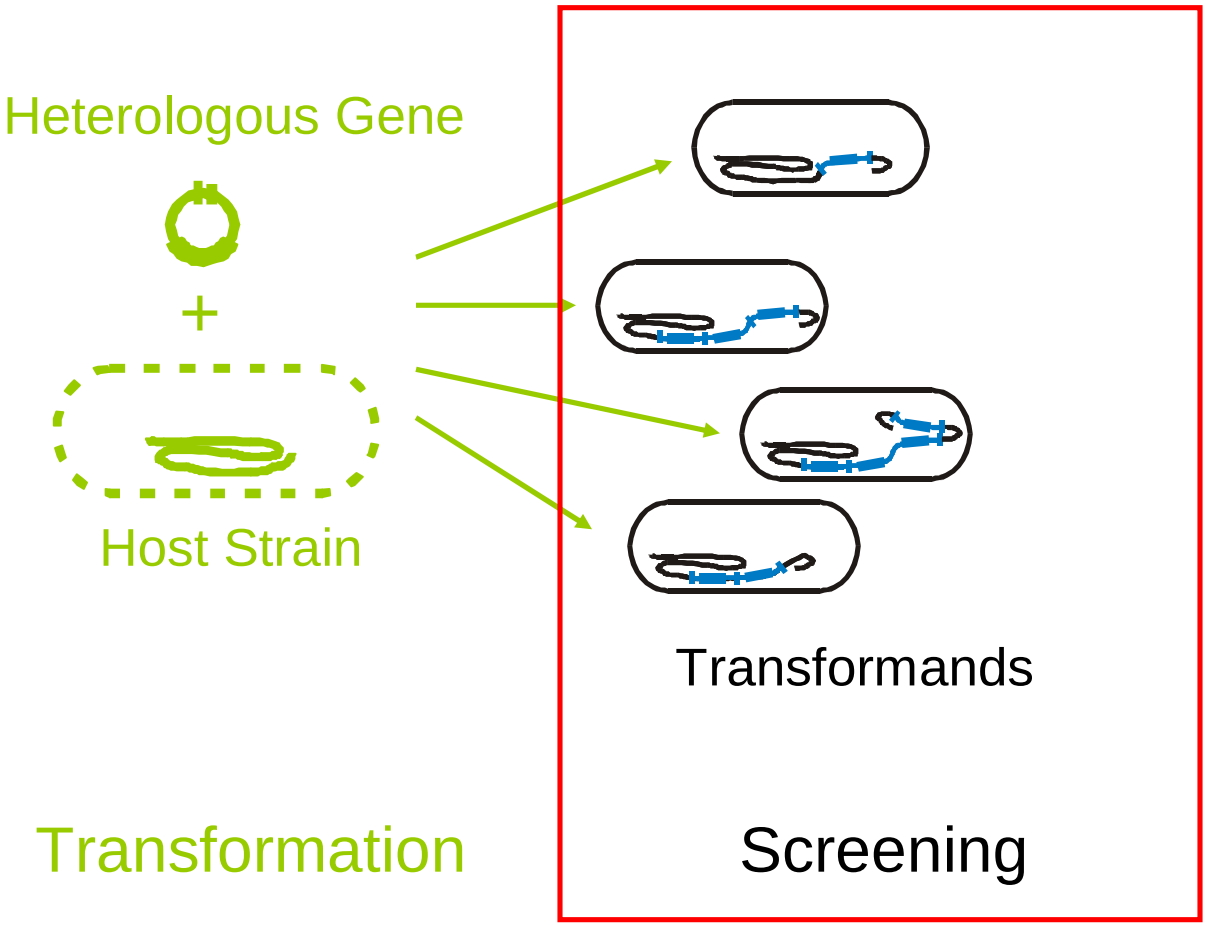
1 Introduction
- Screening at Rhein Biotech GmbH

2 Method
- On-line Measurement of the Oxygen Transfer Rate

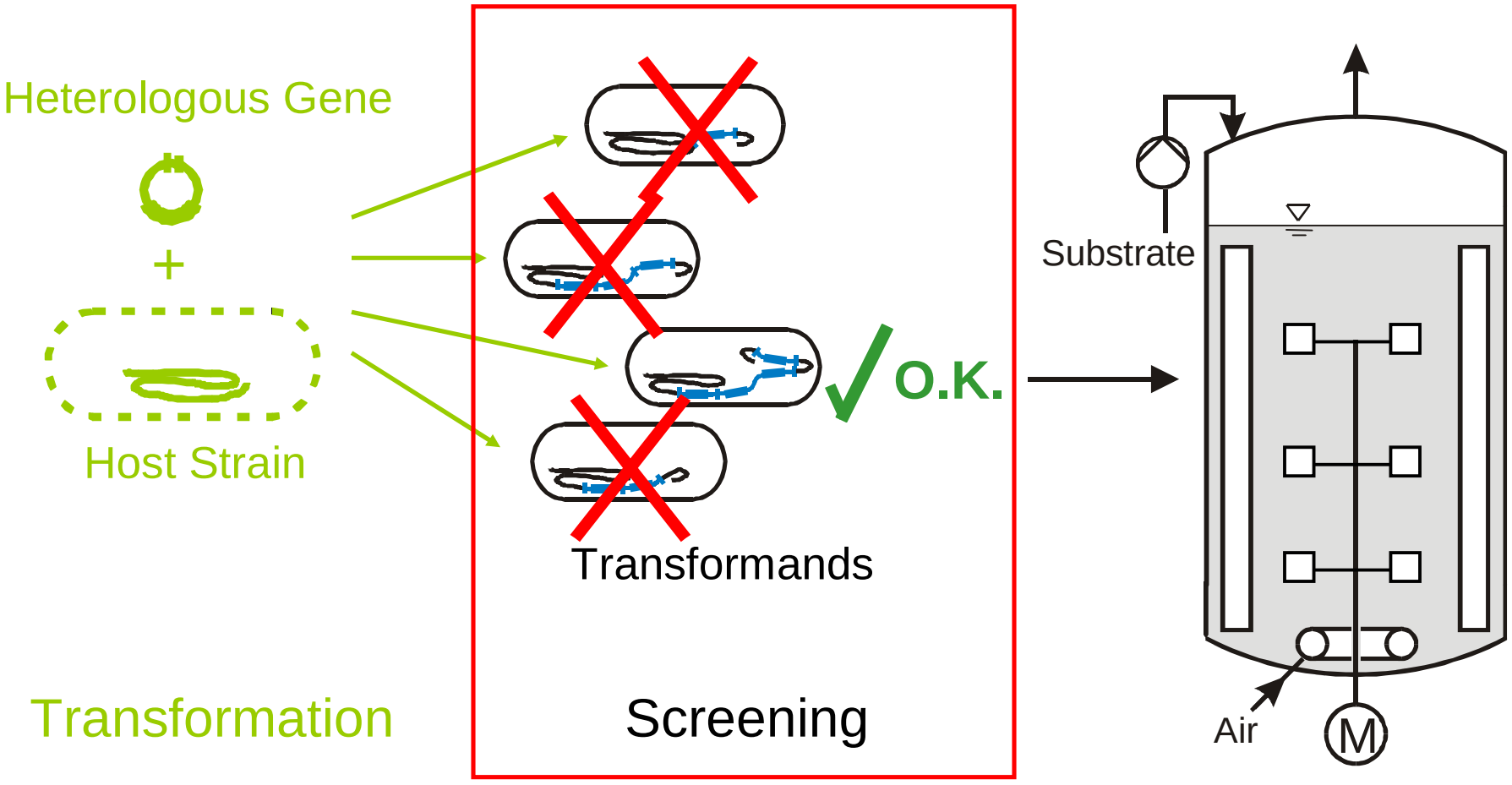
3 Results
- Oxygen Supply
- pH
- Nutrient Supply
- Simulation on the Basis of the Oxygen Transfer Rate

4 Summary

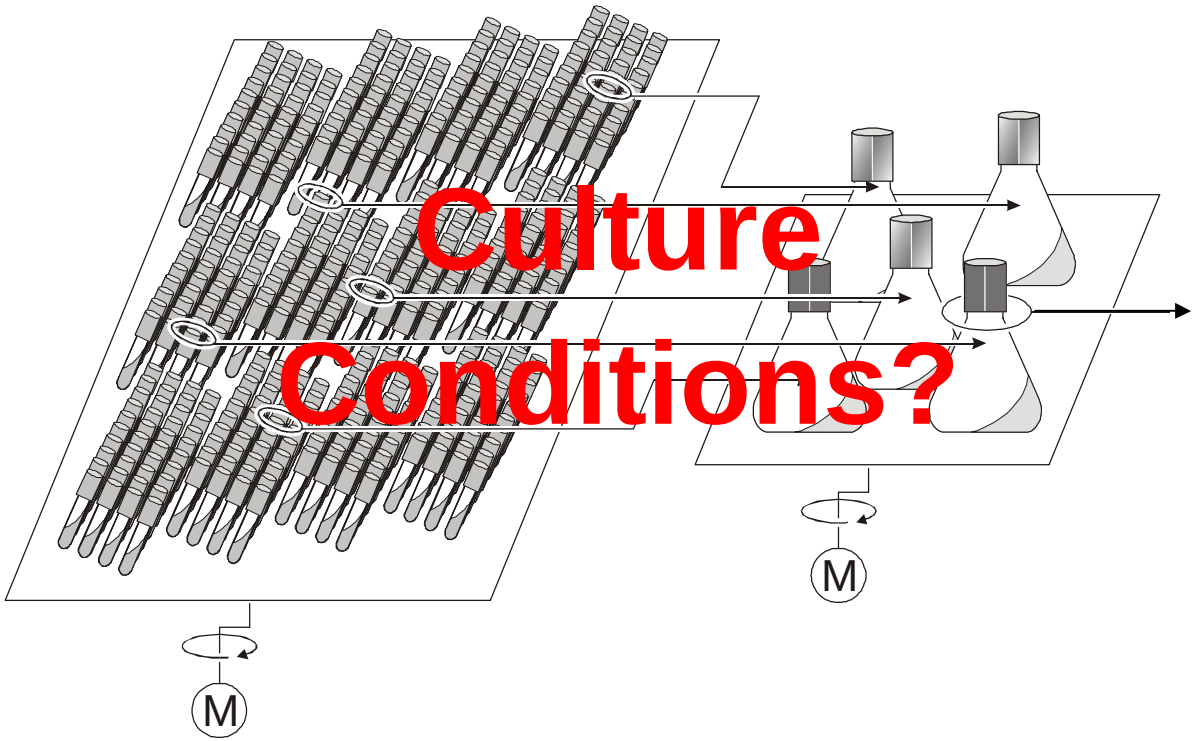
Strain Development on the Basis of *Hansenula polymorpha*



Strain Development on the Basis of *Hansenula polymorpha*



Screening Stages



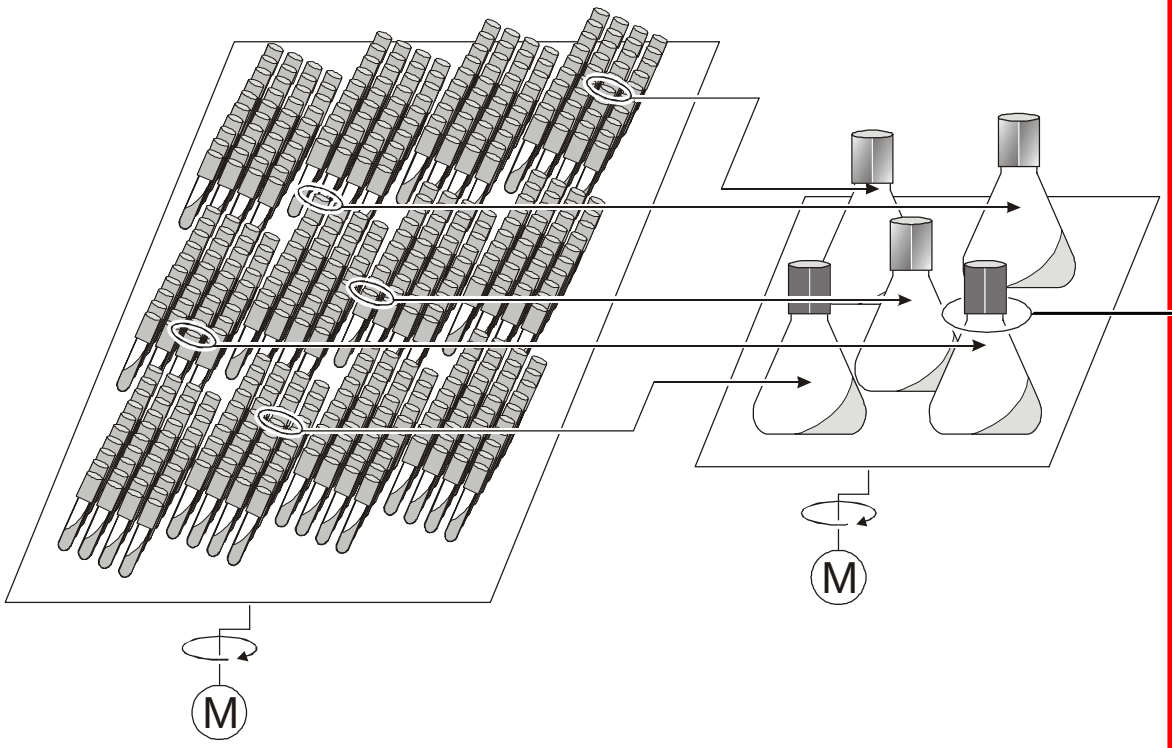
Production
Experiments in
Stirred Tank Reactor

Primary Screening
Shaken Test Tube Cultures
(batch)

Secondary Screening
Shake Flask Cultures
(batch)

Screening Stages

Characterisation and Optimisation



Primary Screening
Shaken Test Tube Cultures
(batch)

Secondary Screening
Shake Flask Cultures
(batch)

Production
Experiments in
Stirred Tank Reactor

Our Key Technology

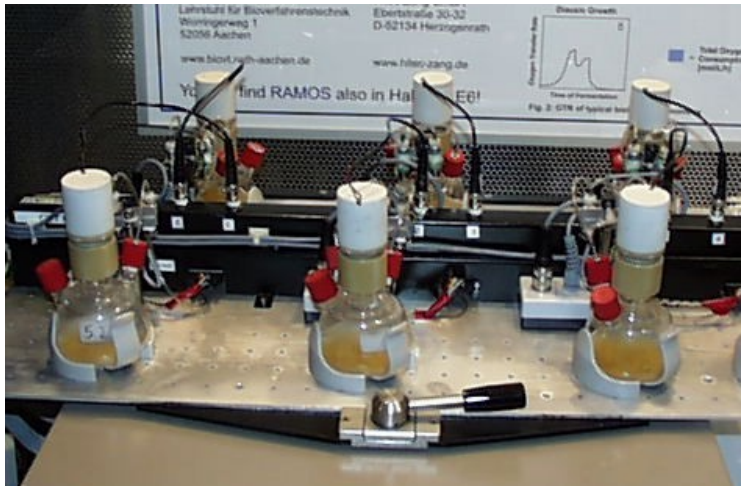
Oxygen Transfer Rate as the Basic Parameter for Characterising the Metabolic Activity of *Hansenula polymorpha* Cultures

↓

Devices for the On-line Measurement of the Oxygen Transfer Rate

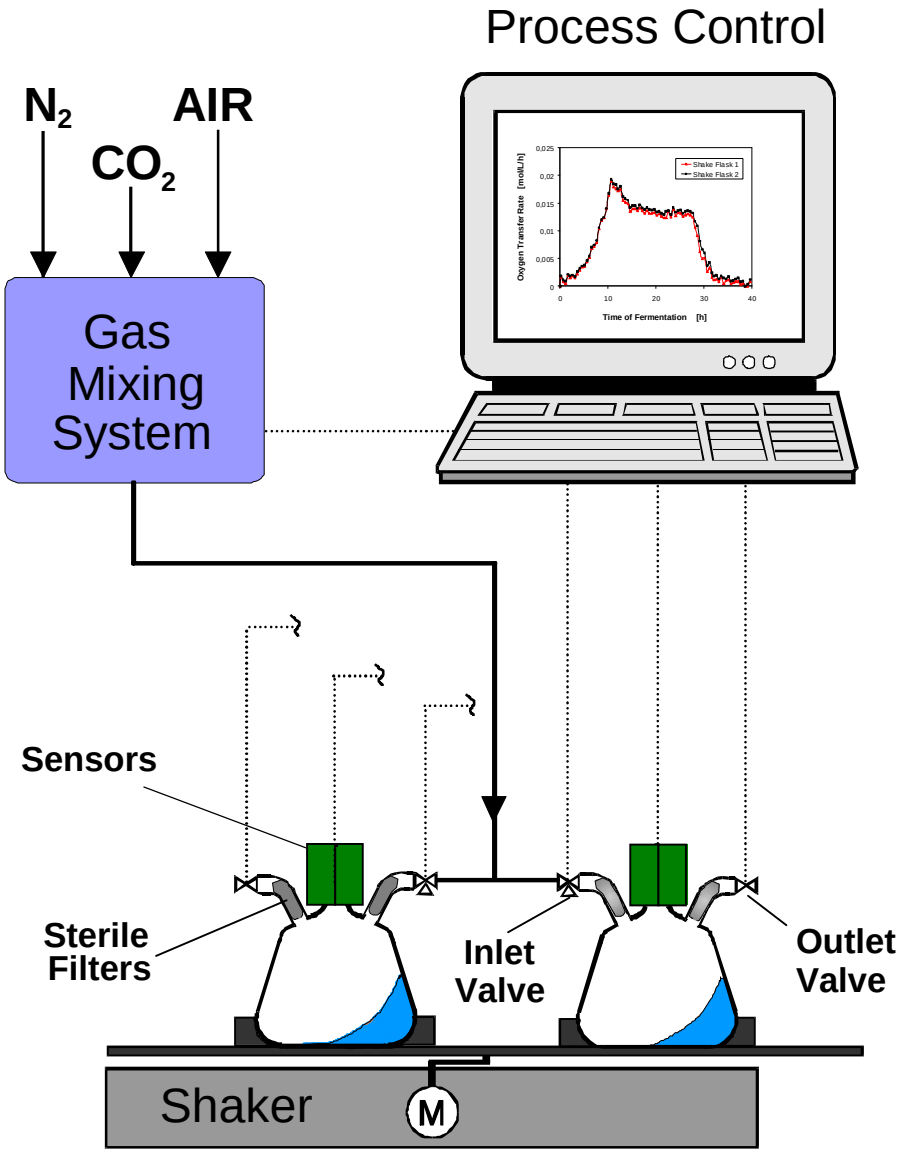
in Test Tubes

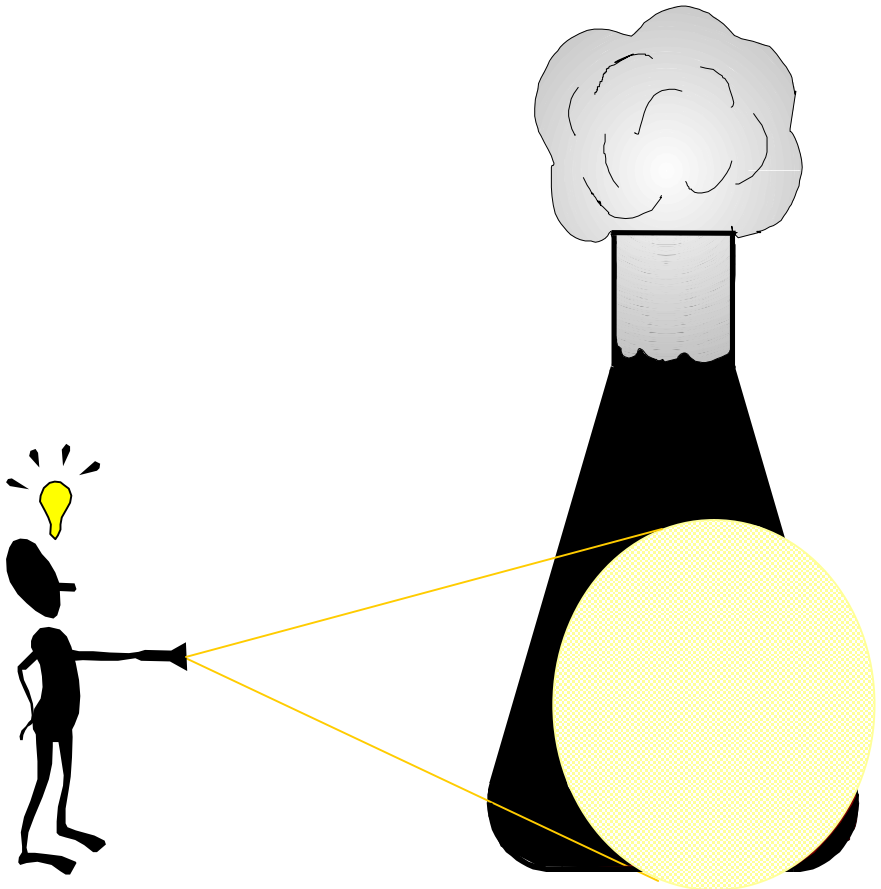
in Shake Flasks



On-line Measurement of the Oxygen Transfer Rate

Flow Scheme





RAMOS

Case study 3

تولید اسید سیتریک

تاری‌خچه

اسید سیتریک اولین بار توسط Carl wilhelm scheel در سال۱۷۸۴ از آبلیمو استخراج شد، ودر سالهای ۱۸۸۰ به روش سنتزی از گلیسرول تهیه شد و چون مواد اولیه و مراحل بازیابی این محصول گران بود در دهه های خیر این اسید به روش بیوتکنولوژی (تخمیری از ملاس چغندر قند و نیشکر تهیه گردید.

موارد استفاده اسید سیتریک

- در شیرینیجات، دسرها، ژله ها و شربت ها.
- در عصاره میوه جات و سبزیجات و میوه جات منجمد.
- در شرابه و نوشیدنیهای غیر اکلی و شربتها.
- در صنایع دارویی و لوازم آرایشی.
- شتشوی فلزات و جرم وزنگ.
- شتشوی شیمیایی (مثل شتشوی ژنراتور های بخار با فشار زیاد)
- پرداخت فلزات به وسیله جریان برق وآب مس کاری
- بازیابی ثانویه نفت
- دباغی و از متورم شدن پوست جلوگیری می کند.
- در صنایع شیمیایی : اسید سیتریک نقطه شروع انواع استر ها و سیترتهای سدیم، آمونیوم، بیسموت، کلسیم، یون فریک، لیتیم، منیزیم، پتاسیم و استانسیم است.
- بسیاری از کاربرد های صنعتی اسید سیتریک بعلت خواص اسیدی و قدرت زیاد جدا کنندگی آن مقبل فلزاتی چون آهن و مس و کبالت و نیکل می باشد.
- در صنایع رنگ سازی

خواص فیزیکی

- کریستالهای آن که در محلولهای آبی سرد به دست می آید بیرنگ و نیمه شفاف و بصورت هیدراته می باشد .
- در درجه حرارت های ۷۵-۷۰ درجه سانتیگراد منو هیدرات شده ورد ۱۵۲-۱۳۵ درجه سانتیگراد ذوب می شود. اسید فوق دارای ثوابت دسوسیاسیون قوی بصورت زیر است.
- (ثابت تعادل در180º C) K1=8.2*10-4
  K2=1.77*10-5 K3=1*10-7
- جدول (۱) جدولی از خواص اسید سیتریک می باشد ،
- اسید سیتریک در آب به راحتی حل می شود. این اسید در حلالهای آلی مانند Alyl acetate,alya alcohol,ethyle acetate و اتر و کلوروفورم نیز حل می شود.

واکنشهای شیمیایی

- اسید سیتریک در تمامی واکنشهای شیمیایی مربوط به ß هیدروکسی اسید ها شرکت می کند، و با از دست دادن آب به اسید آلونئیک و باز دست دادن Co2 به اسید اتیاکونیک (در 175ºF) تبدیل می شود.
- اثر اسیر سولفوریک برروی اسید سیتریک ایجاد اسید فرمیک و اسید ستن دی کربوکسیلیک می کند.هیدروژناسیون آن ایجاد تری کربالیتیک اسید می کند. از خواص مهم اسید سیتریک ایجاد chelating(یک ساختمان مولکولی است که در آن یک یون فلزی با هر یون دیگر در تشکیل یک حلقه شرکت می کنند، الکترونهای شرکت نکرده در ترکیبات حلقوی عامل chelating شناخته شده اند) یا یون های فلزی ۲ ظرفیتی مثل آهن و مس بوده که ایجاد کمپلکس می نماید.

میکرواورگانیسم ها و مواد اولیه سوبسترات و موارد استفاده در تولید اسید سیتریک

- قارچها
- باکتریها
- میکرواورگانیسم های نو ترکیب

قارچها

- دو دانشمند به نامهای Tom and Currie در سال ۱۹۱۶ نشان دادند که تقریبا در تمام گونه های جنس Penicillium مقدار قابل توجه ای اسید که دارای بازدهی خوب می باشد تولید می شود.
- گونه های مختلف آسپرییلوس توانایی تولید اسید سیتریک را داشته ، اما بهترین آنها Aspergilus niger می باشد. از قارچ های دیگر که در تبدیل سلولوز و سایر پلی ساکارید هابه اسید سیتریک ماربرد دارند می توان به Ustruline vulgaris, trichoder mavirie و... را نام برد.
- گونه های قارچ Candida بطور اختصاصی از منابع قند ی، اسید سیتریک تولید می کنند مثل Candida Lipolitic

قارچها

با A.niger غلظت Fe^{+2} در محیط کشت بر تولید اسید سیتریک تاثیر می گذارد. A.niger عموما یک مخلوطی از اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک تولید می کنند و نسبت قسمت های تولید شده می تواند تا مقادیر زیادی با تعدیل غلظت Fe^{+2} کنترل شود.

- مزایای عمده استفاده از A.niger عبارتند از :
- سرعت های رشد سریع تر
- سهولت نگهداری
- دامنه وسیع از سوبستراهای رشد
- پتانسیل برای توسعه فرایندها با جریان مداوم

باکتریها

مهمترین باکتری تولید کننده اسید سیتریک گونه های کونیدفرم مثل

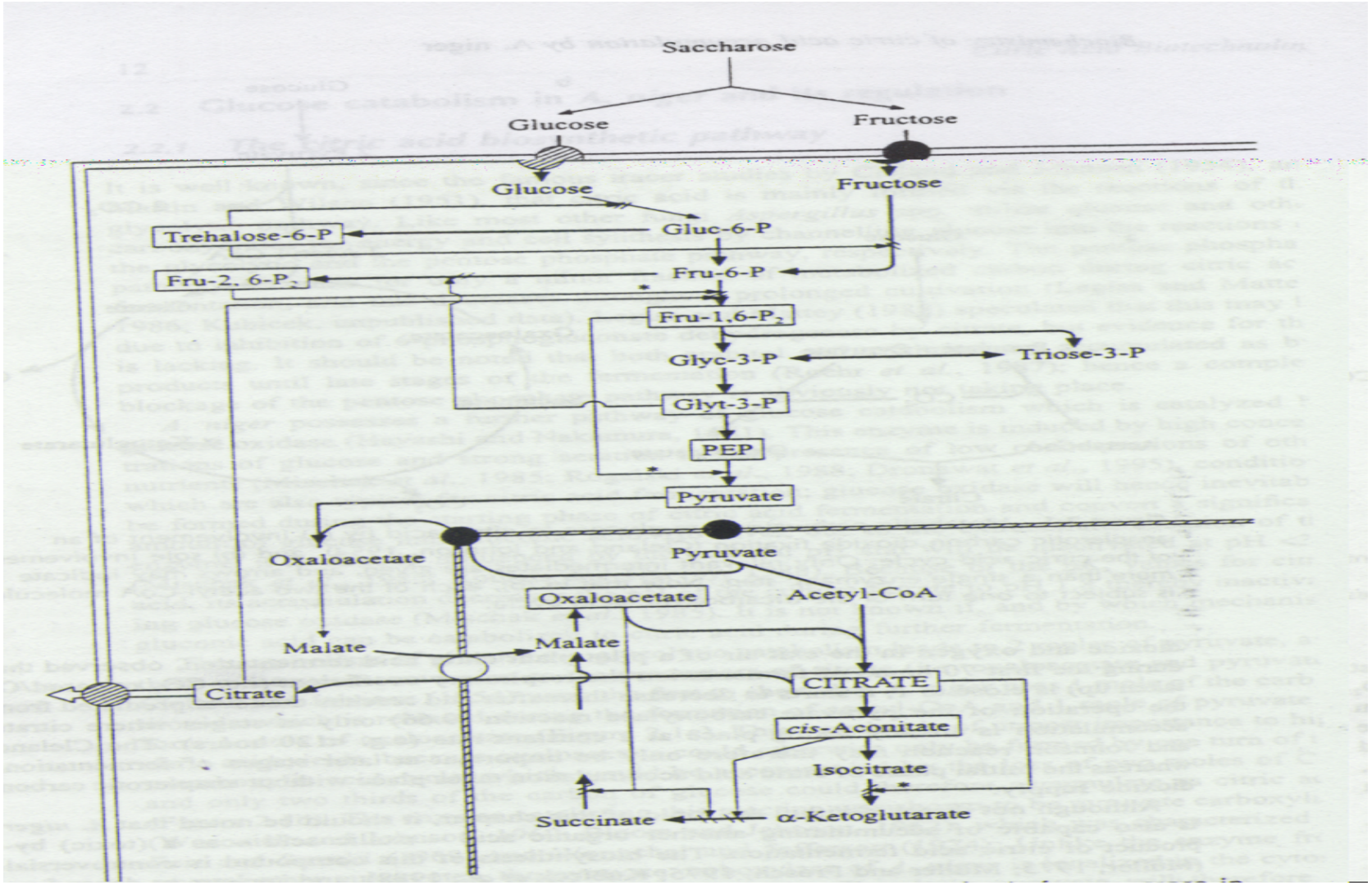
- orynebateria
- Arthro bacteria
- Parffine cis

می باشد.

میکرواورگانیسم های نو ترکیب

- از انجا که موفقیت یک پروسس شیمیایی منوط به میکرواورگانیسم مناسب و مقادیر اپتیمم پارامترهای فرمانتاسیون می باشد لذا انتخاب روش مناسب بسیار اهمیت دارد. امروزه بهروشهای مهندسی ژنتیک میکرواورگانیسم های نوترکیب که اولا سالم بوده و ثانیا بصورت اختصاصی می توانند محصول تولید کنند ، تبدیل کرده اند.
- مهندسین ژنتیک قارچ A.niger را نو ترکییب کرده و انواع مختلف آن را با کد های بین المللی در تولید اسد سیتریک با بازده ای بالا از ملاس چغندر قند و مواد قندی کاربرد داده اند.
- قارچی که در این پروژه جهت تولید اسید سیتریک مورد استفاده قرار گرفته است گونهA niger 5010 می باشد

مکانیسم تبدیل کربو هیدرات ها را توسط A niger



سوبسترات مورد استفاده در عمل تخمیر

کربوهیدراتهای مختلفی جهت تولید اسید سیتریک مورد استفاده قرار می گیرند. این کربو هیدراتها به ۲ دسته تقسیم می شوند.

- مواد اولیه با خاکستر کم، مثل: قند، شکر، چغندر و نشاسته هیدرولیز شده ، از این سوبستراتها در کشت استفاده نمی شود زیرا قیمت این مواد بالا می باشد.
- مواد اولیه با خاکستر زیاد ، مثل: ملاس چغندر قند و نیشکر و نشاسته هیدرولیز شده ی فیلتر شده، مثالهایی از این نوع هستند High molasses نیز که توسط تبخیر جزبه جز نیشکر و همراه با مواد دیگر از نوع مواد با خاکستر زیاد بوده و ارزان قیمت می باشد .

اثر فاکتور های مختلف در تولید اسید سیتریک

- غلظت کربو هیدراتها
- میزان اثر نیتروژن
- اثر میزان فسفات
- اثر PH
- اثر یون فلزات برروی تولید اسید سیتریک
- اثر میزان هوا دهی
- اثر سای‌ر مواد

غلظت کربو هیدراتها

غلظت قندها در محیط کشت، در میزان بازدهی، اسید

سیتریک بسیار موثر است و ماکزیمم میزان باز دهی معمولا

در غلظت قند بین ٪۲۲-۱۴(W/W) بدست می آید.

میزان اثر نیتروژن

- در فرمانتاسیون اسید سیتریک بیشتر بصورت نیترات یا سولفات آمونیوم مورد استفاده قرار می گیرد(ترکیب آمونیمی بعلت کاهش PH ارجح هستند).

- بهترین زمان اضافه کردن ترکیبات نیتروژن(NH^{4+}) به محیط مربوط به زمانی است که سرعت تولید اسید سیتریک کاهش یافته است.

اثر میزان فسفات

اگر یونهای فلزی دارای غلظت محدود نباشند از فسفات

استفاده می شود زیرا باعث تشکیل اسید های قندی و تحریک

رشد سلولی و کاهش تثبیت CO_2 می شود.

اثر PH

در فرمانتاسیون اسید سیتریک پایین بودن PH محیط کشت

بطورموثری در تولید دخالت دارد. زیرا باعث افزایش

راندمان و متوقف شدن تولید اسید اگزالیک می گردد. برای

تنظیم PH از اسید کلریدریک استفاده می شود. مقدار اپتیمم PH

جهت تولید بین ۲،۷-۲ است.

اثر یون فلزات برروی تولید اسید سیتریک

تحقیقات Clark نشان داده است که استفاده از غلظت های کم

فسفات در زمانهایی که مقادیر Zn و Fe در غلظت های

اپتیمم خود باشند میزان بازدهی اسید سیتریک افزایش می

یابد.

اثر میزان هوا دهی

در فرمانتاسیون غوطه ور هوا دهی اهمیت بسیاری دارد و

تولید اسید سیتریک با افزایش هوا دهی افزایش می یابد.

اثر سای‌ر مواد

- اثرمواد چرب: مواد چربی می توانند سبب بالا بردن میزان هوادهی اسید استیک شود.

- اثر نشاسته : نشاسته باعث کاهش مقدار اسپورها و زمان فرمانتاسیون می گردد، نشاسته تاثیر مشخصی بر مورفولوژی می گذارد.

روشهای تهیه و تولید اسید سیتریک

این روشها به دو دسته تقسیم می شوند

- روش اول مربوط به روش غیر تخمیری
- روش دوم مربوط به روشهای بیوتکنولوژی است.

روش غیر تخمیری

این روشها عبارتند از

۱- استخراج اسید سیتریک از آب آنار

۲ -استخراج اسید سیتریک ازآبلیمو

۳- استخراج اسید سیتریک طبق روشAdam,Grimau

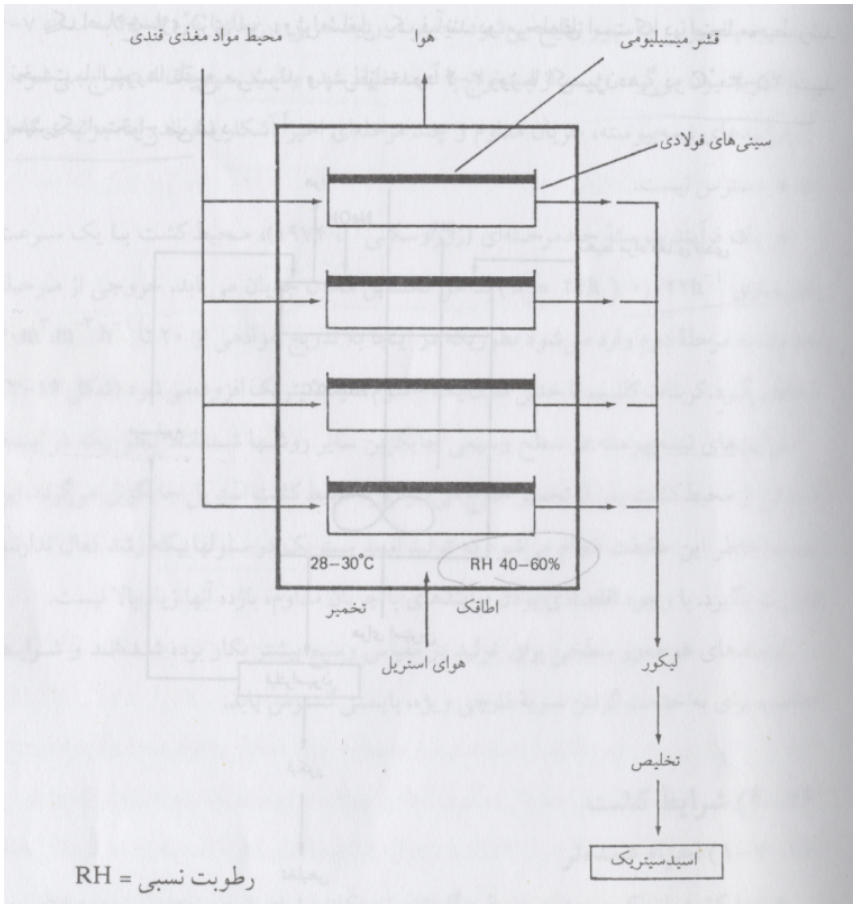
۴- استخراج اسید سیتریک اطبق روش , Wtely Reformatsuey

روش بیوتکنولوژی (تخمیری)در تولید اسید استیک

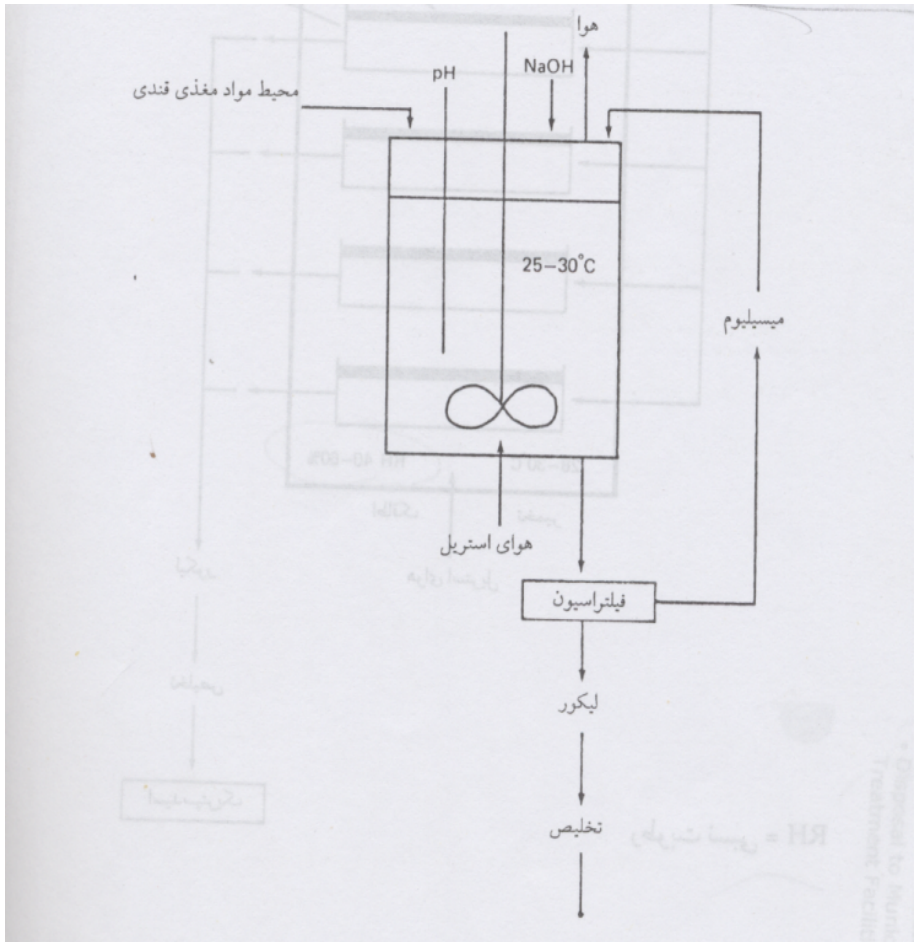
- متد کشت سطحی
- متد کشت غوطه ور
- کشت حالت جامد
- متد Noji که بیشتر در ژاپن کاربرد دارد.

متد کشت سطحی

- در فرآیند های کاسیک تولید اسید سیتریک محلول محیط کشت در حوضچه های کم عمق قرار داده می شود و قارچ به صورت رشته های میسلیومی بر روی سطح محیط تکثیر می یابد. سیستم کشت سطحی شامل اطاق هایی جهت تخمیر می باشد و در آنها سینی های متعددی که توسط یک پایه محکم شده اند قرار گرفته است، سینی ها معمولا از جنس آلومینیوم تقریبا خالص و یا از فولاد زد زنگ می باشند، اندازه این سینی ها بسته به مقدار تولید محصول متغیر بوده و عمق مایع مصرفی نیز متغییر است.



روش کشت غوطه ور



- این تخمیر در بیو راکتور انجام می شود . دو بیوراکتور مور استفاده برای این نوع تخمیر عبارتند از
- Conventional stirred bioreactor
- tower fermentor

بطور کلی برجهای تخمیر نسبت به Conventional stirred bioreactor دارای مزایای زیر می باشد:

۱-هزینه کمتر

۲-امکان ساخت راکتور در مقیاس بزرگتر

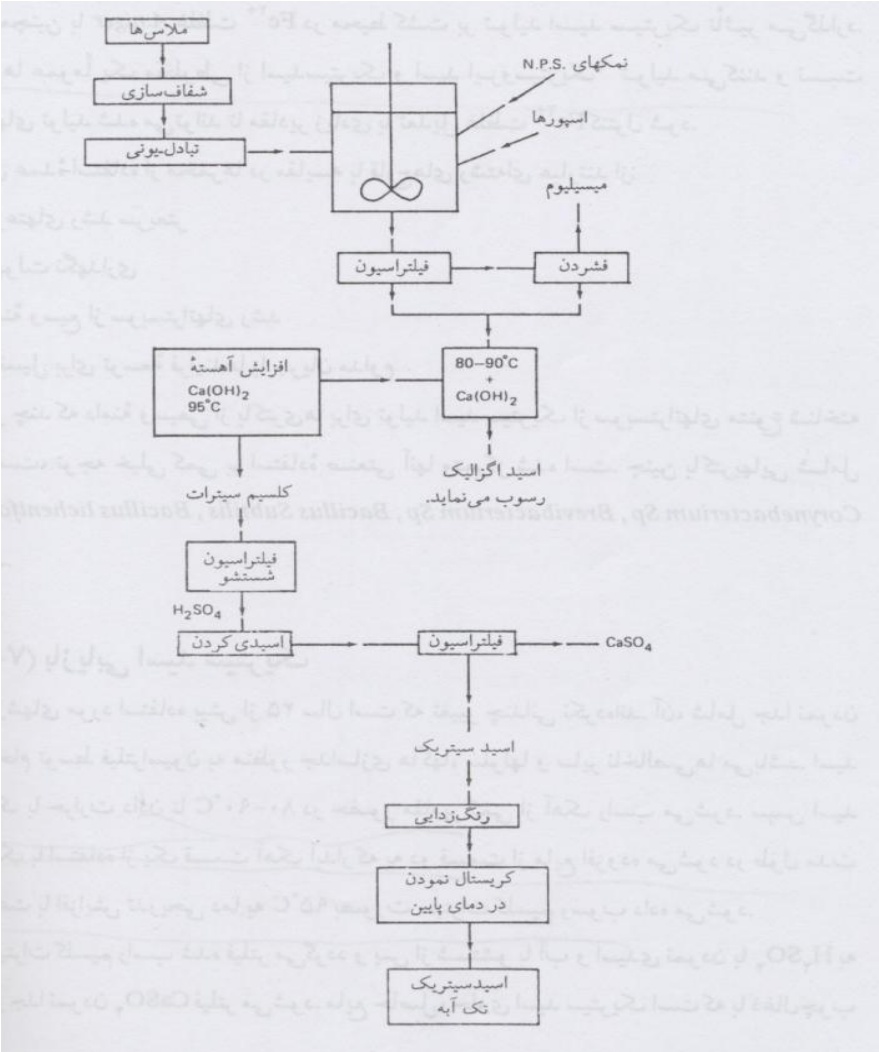
۳-امکان آلودگی کمتر

۴-شرایط بهتر جهت تولید عملیات با جامد معلق

کشت حالت جامد

- این فرایند نخستین بار در سال ۱۹۳۵ توسط Cahn توصیف شد. هرچند که این روش پتانسیل بالایی دارد اما به خاطر شدت زحمت برای هیچ محدوده مهمی در صنعت به خدذمت گرفته نشده است. محیط کشت تخمیری به داخل مواد جاکمد متخلخل نظیر تفاله نیشکر، تفاله سیبزمینی یا چغندرقند، تفاله آناناس و غیره در یک نسبت مناسب پس از الستریل سازی تزریق می گردد. سپس با یک سوسپانسیونی از اسپور تلقیح می شود. خمیر در ردیف هایی دذر دمای ۲۵ تا ۳۰ سانتی گراد به مدت ۶ الی ۷ روز انکوباسیون می گردد و پس از استخراج با آب، تغلیظ شده و اسید سیتریک استخراج می شود .

روشهای بازیابی اسید سیتریک تولید شده به روش غوطه ور



- در این روش جدا کردن میسیلیو مها از سیال تخمیر شده کار مشکلی است برای این منظور در عمل استخراج اسید سیتریک در اشل صنعتی جهت تولید میسیلیومها از یک Filter rotary vaccum drum استفاده می شود.
- در اشل آزمایشگاهی یا نیمه صنعتی توسط سانتریفوژ این عمل صورت می گیرد

شمای کلی طرح تولید اسید سیتریک