

Downstream Processing: il cuore dell'industria biotecnologica del futuro

Dal laboratorio alla scala pilota, le tecnologie DSP trasformano biomasse e matrici biologiche in biofarmaci, molecole nutraceutiche e composti ad alto valore per green chemistry, ottimizzando rese, qualità e sostenibilità della produzione biotecnologica.

DOI 10.12910/EAI2025-076

di Gian Paolo Leone, Daniele Pizzichini, Claudio Russo, Divisione Sistemi Agroalimentari Sostenibili, Laboratorio Bioeconomia Circolare Rigenerativa - ENEA

L'industria biotecnologica da cui derivano biofarmaci (es. anticorpi monoclonali, vaccini, enzimi terapeutici), molecole per applicazioni in ambito food/nutraceutica e di green chemistry (es. agrofarmaci, intermedi per materiali biobased, pigmenti) ha conosciuto nell'ultimo ventennio una crescita senza precedenti. Il passaggio alla scala industriale avvenuto a cavallo degli anni 2000 ha pertanto assegnato un ruolo centrale al downstream processing (DSP), inteso come le operazioni che seguono l'upstream, ossia la crescita/raccolta della biomassa cellulare (fermentazioni, colture cellulari/batteriche, processi di lisi spontanea o per via enzimatica), fino all'ottenimento del prodotto finale. Il valore economico di tale comparto nel 2024 è stato pari a \$41,8 Mld: al 2030 si prevede varrà più del doppio, trainato dalla crescente domanda di anticorpi, vaccini e proteine ricombinanti¹. In termini generali, il DSP include (Figura 1):

- la fase di recupero/estrazione che attua un primo disassemblaggio della massa cellulare prodotta in upstream con rimozione del materiale grossola-

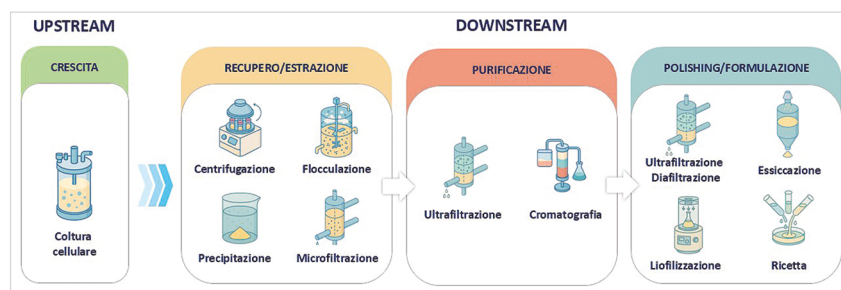


Figura 1 - Upstream e downstream processing applicato a produzioni biotecnologiche e principali tecnologie utilizzate.

no. Tecnologie di riferimento includono la centrifugazione, la flocculazione, la filtrazione di profondità o la microfiltrazione;

- la purificazione in cui, con passaggi successivi, si isola la molecola target. Processi cromatografici in varie architetture sono usati per la separazione chemoselettiva di pool molecolari (es. frazioni proteico-peptidiche indesiderate dal pool proteico/peptidico di interesse); ad essi possono essere accoppiate fasi di concentrazione/purificazione preliminare mediante ultrafiltrazione;
- il polishing e la formulazione in cui si avvicinano fasi di ulteriore purificazione e di miscelazione con componenti/eccipienti, per creare il

biofarmaco/bioformato finale. L'ultrafiltrazione e la diafiltrazione sono qui utilizzate per il fine-tuning di separazioni tramite l'allontanamento di molecole di piccola dimensione come i sali presenti nelle soluzioni tampone. Processi di diafiltrazione a passaggio singolo favoriscono l'esercizio in continuo². In fase di formulazione il principio attivo target è sottoposto all'aggiunta di componenti minori, o stabilizzato in forma di polvere, liofilo o estratto oleoso.

Un caso a parte riguarda i processi estrattivi a fluidi supercritici per l'ottenimento di molecole lipofile (es. provitamine, pigmenti, molecole antiossidanti) a partire da matrici algali o batteriche³ che consente il

recupero del prodotto target nelle fasi precoci della produzione e da cui possono derivare ulteriori fasi di valorizzazione a cascata del pannello disoleato, spesso di natura proteica^{4, 5}.

Applicazioni ENEA delle tecnologie DSP in ambito biotecnologico

La Divisione AGROS ha di recente impiegato tecnologie di norma applicate a matrici agroalimentari primarie e secondarie, per la messa a punto di processi DSP di produzioni biotecnologiche.

Processi a membrana sono attualmente utilizzati nel progetto PANHUB, parte della strategia europea e nazionale di contrasto alle pandemie e antibiotico-resistenze, per processare anticorpi terapeutici prodotti attraverso la tecnologia del plant molecular farming. Il ricorso alla ultrafiltrazione ceramica ha permesso la concentrazione/purificazione a freddo dell'estratto vegetale da avviare alla fase di cromatografia. Studi ulteriori sono invece necessari per la messa a punto della fase di chiarificazione dell'omogenizzato vegetale mediante microfiltrazione ceramica. Riferendosi a modelli biologici come gli esosomi (nanovesicole presenti in matrici vegetali, ricche di composti bioattivi quali acidi nucleici, polifenoli, lipidi e proteine), ENEA in collaborazione con Navhetec S.r.l e Agrumaria Corleone, ha brevettato⁶ un processo di purificazione e incapsulamento di esosomi estratti dal succo di limone mediante ricorso a tecnologie di filtrazione e spray-drying con formulazione di polveri ad uso nutraceutico e cosmetico. Il processo, validato su scala pilota, ha consentito la commercializzazione di un ingrediente funzionale (CitraVes™) destinato a integratori, alimenti, bevande e cosmetici con azione antinfiammatoria, antiossidante e preventiva di malattie cardiovascolari.

Tecniche di spray-drying sono state adottate su scala laboratorio nel Proof of Concept VEG4FUN (Cellule VEGetali per il manufacturing di Food ad alto valore Nutrizionale) per il microincapsulamento di colture cellulari (basilico, perilla, carciofo) attraverso il ricorso a carrier commerciali o derivati da sottoprodotti agroalimentari (siero di latte), ottenendo polveri con proprietà antiossidanti e ricche in polifenoli. Un approccio analogo ha permesso il trattamento di estratti di biomassa batterica con produzione di una polvere idrosolubile ricca di violaceina, pigmento naturale con proprietà antimicrobiche, antitumorali e immunostimolanti⁷.

Nel campo della tecnologia a fluidi supercritici, ENEA ha brevettato⁸ un processo per l'estrazione selettiva della torularodina da biomassa deidratata di cellule microbiche lisate. Il processo, costituito da due step successivi, ha permesso di ottenere un primo estratto oleoso ricco dei carotenoidi apolari (torulene, γ -carotene e β -carotene) e un secondo estratto con contenuto di torularodina superiore al 95% in carotenoidi totali con proprietà antiossidanti, anticolesterolemiche e antinfiammatorie, antimicrobiche e antitumorali. Con la medesima tecnologia validata sino alla scala pilota, è stato messo a punto un processo estrattivo di microalghe nel Progetto Horizon 2020 BBI VALUEMAG (Valuable Products from Algae Using New Magnetic Cultivation and Extraction Techniques) ottenendo molecole ad alto valore biologico quali carotenoidi antiossidanti (es. astaxantina, luteina) e acidi grassi mono e polinsaturi (es. ω 3 - EPA) per utilizzi in ambito food, nutraceutico, cosmetico⁹. Sono attualmente in corso attività analoghe nel Progetto Horizon Europe PROTEIN4IMPACT (Impact of alternative PROtein sources to improVE nutrition) in un quadro

più ampio di sfruttamento a cascata della risorsa biologica attraverso il recupero della frazione proteica dalla biomassa disoleata.

Il posizionamento ENEA nel quadro delle sfide industriali

La presenza di Hall Tecnologiche (Figura 2) ospitanti le principali tecnologie di DSP utilizzate nell'industria biotecnologica (filtrazione a membrana,



Figura 2 - Centro di Innovazione Integrato Agrobiopolis (CR Trisaia, Rotondella, MT)

fluidi supercritici, spray-drying), rappresenta un elemento centrale del Dip. SSPT per lo studio dei processi biotecnologici dalla produzione alla formulazione finale.

La capacità di R&S su scala banco e pilota consente la validazione di processi DSP su matrici biotecnologiche in termini di rese e qualità finali e abilita al successivo passaggio verso la scala preindustriale. L'acquisizione in linea di parametri operativi, anche in condizioni di processo continuo (Figura 3) (es. stima in tempo reale del fouling di membrana), supporta lo sviluppo di modelli predittivi che, insieme ai sistemi di Big Data e machine learning, diventano la chiave per indirizzare la produzione biotecnologica secondo i principi di Quality by Design (QbD), sfruttando a pieno il potenziale delle tecnologie analitiche di processo, secondo un rigoroso controllo in-process.

L'intensificazione del DSP rappresenta un'ulteriore sfida per superare il collo di bottiglia che ad esso si associa e ridurre l'incidenza sul costo



Figura 3 – Sistemi continui di filtrazione (micro e ultrafiltrazione; nanofiltrazione e osmosi inversa) tangenziale a membrana presso Hall Tecnologica Processi Agroindustriali (CR Casaccia, Roma).

menti o stoccaggi intermedi (minori spazi/apparecchiature), rappresenta uno degli aspetti strategici auspicabili consentendo la riduzione dei tempi di processamento, delle perdite e il miglioramento della qualità dei prodotti. In questa direzione il Dip. SSPT è in grado di coniugare le competenze maturate sul DSP con la capacità di elaborazione di nuovi materiali, promuovendo così lo sviluppo di soluzioni di cromatografia avanzata (a membrana¹¹) per la realizzazione di separazioni “fini” in modalità continue; inoltre, il ricorso a tecnologie di spray-drying o sistemi supercritici possono favorire la messa a punto di processi evaporativi continui¹².

per info: gianpaolo.leone@enea.it

totale di produzione che attualmente può arrivare all'80%¹⁰. L'elaborazio-

ne in continuo del prodotto in fase di DSP, senza necessità di condiziona-

Riferimenti bibliografici

1. Grand View Research, Inc. (2025). Downstream Processing Market (2025–2030) Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Chromatography Systems, Filters), by Technique (Purification, Formulation), by Application, by Region, and Segment Forecasts (Grand View Research). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/downstream-processing-market/toc>
2. Fuchs, M., Bhawnani, R., Sripada, S.A., Molek, J., and Ghodbane, M. (2023). Predictive modeling of single pass tangential flow filtration for continuous biomanufacturing. *Biotechnology Progress* 39, e3353.
3. Abou Elmaaty, T., Sayed-Ahmed, K., Elsis, H., and Magdi, M. (2022). Optimization of Extraction of Natural Antimicrobial Pigments Using Supercritical Fluids: A Review. *Processes* 10, 2111.
4. Nunes, E., Odenthal, K., Nunes, N., Fernandes, T., Fernandes, I.A., and Pinheiro De Carvalho, M.A.A. (2024). Protein extracts from microalgae and cyanobacteria biomass. Techno-functional properties and bioactivity: A review. *Algal Research* 82, 103638.
5. Obeid, S., Beaufils, N., Peydecastaing, J., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., and Pontalier, P.-Y. (2022). Microalgal fractionation for lipids, pigments and protein recovery. *Process Biochemistry* 121, 240–247.
6. Navhetec s.r.l. (2020). Procedimento per la produzione di vescicole da succo di agrumi (Procedure for the production of citrus juice vesicles). <https://patentimages.storage.googleapis.com/f7/54/da/6c572478a68183/IT201900005090A1.pdf>
7. Trupo, M., Magarelli, R.A., Palazzo, S., Larocca, V., Martino, M., Spagnoletta, A., and Ambrico, A. (2025). Bioconversion of a Dairy By-Product (Scotta) into Mannitol-Stabilized Violacein via *Janthinobacterium lividum* Fermentation. *Microorganisms* 13, 2125.
8. Larocca, V., Trupo, M., Ambrico, A., Martino, M., Magarelli, R.A., Balducchi, R., and Spagnoletta, A. (2023). Metodo di estrazione selettiva della *Torularodina* mediante la tecnica della CO2 supercritica. <https://brevetti.enea.it/elenco.php?OK=Y&idDE=964>
9. Molino, A., Mehariya, S., Di Sanzo, G., Larocca, V., Martino, M., Leone, G.P., Marino, T., Chianese, S., Balducchi, R., and Musmarra, D. (2020). Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization* 36, 196–209.
10. Guajardo, N., and Schrebler, R.A. (2023). Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology. *Pharmaceutics* 16, 38.
11. Chen, J., Yu, B., Cong, H., and Shen, Y. (2023). Recent development and application of membrane chromatography. *Anal Bioanal Chem* 415, 45–65.
12. O'Sullivan, A., Ryan, K.M., and Padrela, L. (2022). Production of biopharmaceutical dried-powders using supercritical CO2 technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 187, 105645.