

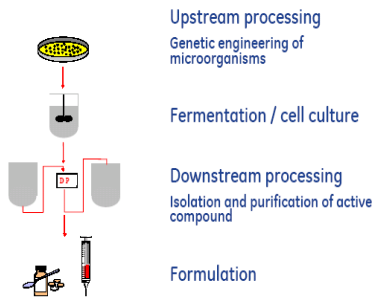
Downstream processing

Nur Hidayat

Downstream processing

Downstream Processing comprises all operations required for extraction and purification of a product produced by a biotechnological process such as microbial fermentation, plant and tissue culture, transgenic plants and animals.

Production Cycle



Fermentation

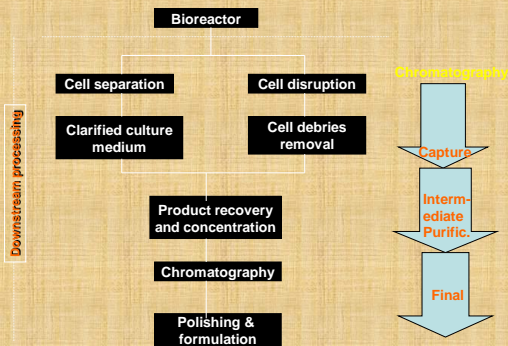
Fermentation is the term used by microbiologists to describe any process for the production of a product by means of the mass culture of a microorganism.

Fermentation Basics

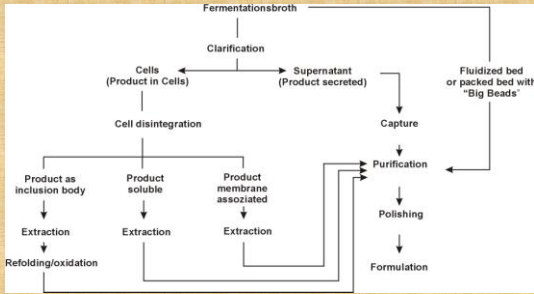
The **product** can either be:

- The cell itself: referred to as biomass production.
- A microorganisms own metabolite: referred to as a product from a natural strain.
- A microorganisms foreign product: referred to as a product from recombinant DNA technology or genetically engineered strain, i.e. recombinant strain.

Stages in downstream processing



Downstream processing

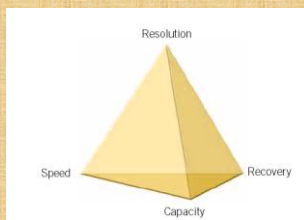


Generalized flow chart for purification of a protein from a culture broth

Downstream processing / Bioseparations / Purifications

It may not always be necessary to follow a long and difficult path to obtain a pure protein;

Proper planning and a smart choice and integration of separation techniques can be used to fulfil the need for an efficient, clean and cost-effective process.



Every technique offers a balance between resolution, capacity, speed and recovery.

Economic aspects of downstream processing

- **Recombinant technology has established well upstream processing**
- **Downstream processing/bioseparation is a major challenge for bioindustry**
- **Upto 80% of the product costs are incurred on downstream processing**

Protein bioseparation costs

Product	Approximate relative price	Biosep. cost as % of total cost of production
Food additives	1	10 – 30
Nutraceuticals	2 – 10	30 – 50
Industrial enzymes	5 - 10	30 – 50
Diagnostic proteins	50 -100	50 – 70
Therapeutic proteins	50 – 500	60 – 80

Why downstream/purification?

- **Reduction in bulk**
- **Concentration enrichment**
- **Removal of specific impurities (e.g., toxins from therapeutic products)**
- **Prevention of catalysis other than the type desired (for enzymes)**
- **Recommended product specifications (e.g., pharmaceuticals requirement)**
- **Enhancement of protein stability**
- **Reduction of protein degradation (e.g. by proteolysis)**

Modify the upstream processes to aid in downstream purification by:

- 1) Selection of organisms that do not produce undesirable pigments or metabolites
- 2) Modify the fermentation conditions so that undesirables are not produced
- 3) Precise timing of harvest
- 4) pH & temperature control after harvesting
- 5) Addition of flocculating agents
- 6) Addition of antifoams that do not cause purification problems

Protein Products

Food/Food additives/Nutraceuticals

Egg albumin
Casein
Soy proteins
Whey protein concentrate
Protein hydrolysates
Alpha lactalbumin
Beta lactoglobulin
Lysozyme

Pharmaceuticals

Monoclonal antibodies
Serum albumin
Serum immunoglobulins
Tissue plasminogen activator
Urokinase
Streptokinase
Insulin
Interferon

Industrial Enzymes

Hemicellulose
Glucose isomerase
Alpha amylase
Penicillin G acylase
Alkaline proteases
Celluloses

Diagnostic enzymes

Peroxidase
Glucose oxidase

Miscellaneous

Detergent enzymes
Digestive enzymes
Enzymes used in cosmetics

RIPP

- Removal
- Isolation
- Purification
- Polishing

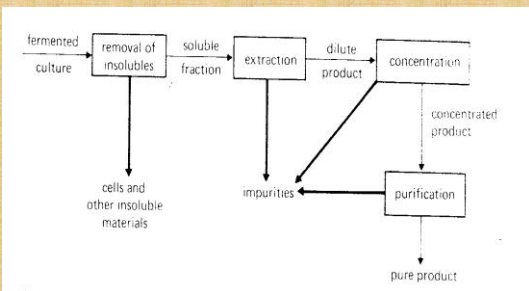
Downstream processing - Operation sequence

1. **Removal of particulates (insolubles):** common operations are filtration, centrifugation, also sometimes settling/decanting, also new absorbents developed
2. **Primary isolation:** solvent extraction, precipitation, ultrafiltration *desired product concentration increases significantly*
3. **Purification:** Fractional precipitation, several types chromatography- **bulk impurity removal as well as further product concentration**
4. **Final product isolation (Formulation):** final centrifugation, freeze drying, stability considerations, regulatory approvals, toxin and pyrogen free etc.

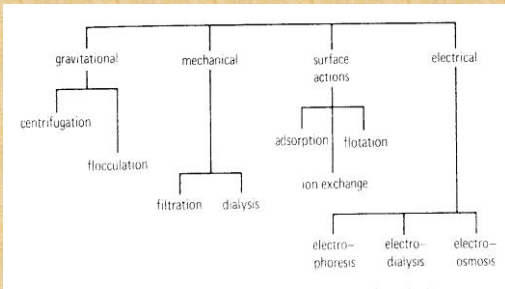
Unit operations in downstream processing

<p>Cell separation</p> <ul style="list-style-type: none"> flocculation centrifugation filtration <p>Cell disruption</p> <ul style="list-style-type: none"> homogenizers hydrolytic enzymes <p>Clarification</p> <ul style="list-style-type: none"> centrifugation filtration <p>Concentration</p> <ul style="list-style-type: none"> precipitation chromatography ultrafiltration partitioning distillation 	<p>High resolution techniques</p> <ul style="list-style-type: none"> chromatography electrophoresis dialysis <p>Finishing/packaging</p> <ul style="list-style-type: none"> crystallization filtration gel chromatography drying
---	--

Skema umum untuk penapihan produk ekstraseluler yang larut.



Pemisahan Bahan yang Tidak Larut



Sentrifugasi

- Sentrifugasi meliputi pemisahan cairan dan partikel berdasar densitas.
- Sentrifugasi dapat digunakan untuk pemisahan sel dari cairan kultur, sel pecah dari cairan, dan kelompok endapan
- Ada sejumlah tipe sentrifus, beberapa diantaranya:

Tubular Bowl Centrifuge

- Paling umum digunakan untuk pemisahan padat-cair, isolasi enzim.
- Dapat dicapai pemisahan yang baik untuk sel mikrobia dalam larutan.

Disc Bowl Centrifuge

- Secara luas digunakan untuk memisahkan sel.
- Dapat untuk memisahkan sel mikrobia yang dipecah dan endapan protein

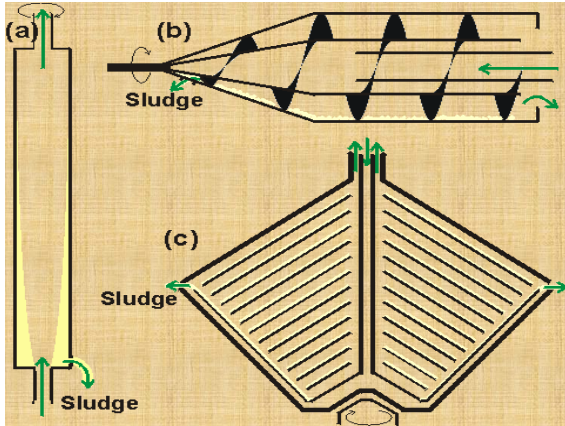
Sentrifugasi

Perforate Bowl Basket Centrifuge

- Pengecualian pada pemisahan adsorbent, seperti selulosa dan agarosa.

Zonal Ultracentrifuge

- Digunakan dalam industri vaksin karena dapat secara mudah memisahkan sel yang dipecah dari virus.
- Dapat untuk mengendapkan protein dengan baik.
- Secara eksperimental digunakan untuk pemurnian RNAPolimerase berbagai enzim.



Koagulasi dan Flokulasi

- Koagulasi ditetapkan untuk proses-proses biologikal jika partikel kecil secara langsung melekat satu dengan lainnya.
- Flokulasi adalah agensia yang bekerja untuk menggabungkan partikel
- Teknik koagulasi dan flokulasi biasanya digunakan untuk sel utuh, sel pecah atau protein terlarut.

Sel Utuh

- Banyak agensia flokulasi digunakan untuk pemisahan produk, seperti : polielektrolit anionik dan kationik, alumina, dan polimer sintetik.
- Sedikit informasi yang diketahui tentang koagulan, tetapi beberapa koagulan anorganik aluminium, garam besidan garam kalsium telah banyak dipelajari

Koagulasi dan Flokulasi

Sel hancur dan protein

- Koagulasi dan flokulasi banyak digunakan dengan dilakukan agitasi
- Koagulasi dan flokulasi dapat digunakan sebagai alternatif metode presipitasi pada pemisahan enzim
- Agensia yang digunakan untuk sel utuh adalah sama dengan untuk sel hancurmaupun protein

Presipitasi

- Presipitasi adalah prosedur penambahan larutan ionik untuk membuat larutan fermentasi menjadi bentuk partikel yang tidak larut.
- Presipitasi biasanya untuk memisahkan enzim atau protein
- Cara yang sederhana biasanya dengan mengubah pH dan suhu
- Presipitasi dapat dilakukan secara batch atau kontinyu.

Variasi suhu dan pH

- Umumnya kebanyakan protein dan enzim meningkat kelarutannya dengan meningkatnya suhu
- Dengan mengatur pH, polaritas enzim dapat diturunkan sehingga tidak bermuatan, polaritas yang paling rendah menjadikan enzim sedikit larut dan cairan.

Presipitasi

Presipitasi oleh Solven Organik

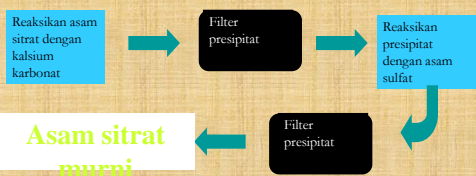
- Dengan penambahan solven organik ke cairan fermentasi, konstanta dielektrik akan turun menyebabkan keluturan berkurang.
- Sering digunakan secara industri karena murah dan sederhana

Presipitasi oleh Ion Logam

- Garam metal dengan solubilitas lebih rendah dapat dibentuk oleh enzim dan protein.
- Garam Mangan dapat digunakan untuk pengendapan asam nukleat.

Pemurnian Asam Sitrat

- Metode yang digunakan dalam pemurnian asam sitrat dari cairan fermentasi terdiri dari dua teknik: presipitasi dan filtrasi
- Secara skematik dapat dipelajari pada contoh berikut.



Pemurnian Asam Sitrat

- Cairan asam sitrat dari fermentor produksi sangat terkontaminasi oleh biomass, garam, sukrosa, dan air.
- Pertama, asam sitrat harus direaksikan dengan kalsium karbonat untuk menetralkan larutan dan membentuk presipitat tidak larut kalsium sitrat
- Kalsium sitrat mengandung asam sitrat 74%.
- Reaksi Kimianya adalah:
 $\text{CaCO}_3 + \text{Citric Acid} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{Calcium Citrate}$



Pemurnian Asam Sitrat

- Kalsium sitrat kemudian dicuci, dipanaskan dan disaring untuk menghilangkan kontaminan
- Tergantung rancangan skema pemurnian, filter dapat ditempatkan sebelum reaksi pertama dengan kalsium karbonat.
- Secara sederhana filter dapat memisahkan sebagian besar kontaminan tergantung ukurannya dilanjutkan untuk kontaminan yang lebih kecil pada filter berikutnya



Pemurnian Asam Sitrat

Pemurnian lanjut:

- Asam sitrat dapat dihasilkan dalam dua bentuk: - monohidrat dan anhidrat
- Bentuk-bentuk ini membutuhkan tambahan tahap pemurnian untuk mencapai kemurnian yang diinginkan
 1. Monohydrate
 - Mengandung satu molekul air untuk tiap asam sitrat
 - Memerlukan kristalisasi berulang sampai kandungan air sekitar 7.5-8.8%
 2. Anhydrous
 - Memisahkan semua air dari produk akhir
 - Dibuat dengan dehidrasi produk asam sitrat monohidrat pada suhu di atas 36,6°C
