

Production of powdered beta-carotene from native halophilic bacteria in industrial factories in Bushehr province

**Fatemeh Papari Barjasteh^{*1}, Roghayeh Zendehe Boodi¹,
Narjes Lotfizadeh¹, Zahra Zarin Kolah¹, Fatemeh Nazemi¹**

1. Educational and Researching Center "Viragene" – Bushehr, Iran.

* Corresponding author: viragene.bu@gmail.com, orcid: 0000-0002-9492-9325

Received: 14/02/2026 Revised: 22/02/2026 Accepted: 02/03/2026

Abstract

Global shifts in industrial biotechnology have redirected the production of bioactive compounds from chemical synthesis toward green microbial processes. Among these, beta-carotene (β -carotene)—a natural orange-red pigment and potent antioxidant—holds extensive applications in the food (natural coloring), pharmaceutical (Vitamin A precursor), and cosmetic industries. Numerous studies have demonstrated that halophilic microorganisms, particularly species such as *Halobacterium salinarum* and members of the *Halomonas* genus, exhibit a remarkable ability to accumulate β -carotene within their cell membranes under oxidative stress and high salinity conditions. This characteristic renders them ideal production platforms for Iran's arid and semi-arid climates. The present project aims to design and simulate a knowledge-based industrial production line in Bushehr Province for the high-purity powdered beta-carotene production using native halophiles from this region. The production pathway comprises three main stages: 1) Primary cultivation and biomass scaling in CSTR bioreactors with a working volume of 5 m^3 ; 2) Induction of β -carotene production via light stress and salinity levels of 15–20%; and 3) Extraction and purification using green solvents (edible oils and ethanol) followed by spray drying. Preliminary results based on laboratory data indicate that industrial-scale yields can reach 1.2 to 2 g/L, ensuring economic viability. This project represents a significant step toward a resilient economy, aiming to reduce the import of synthetic beta-carotene—valued at approximately \$12 million annually (Iranian Customs statistics, 2023/2024)—and generate direct employment for 35 individuals in the Bushehr Special Economic Zone.

Keywords: halophilic bacteria, native halophiles, beta-carotene

تولید بتاکاروتن پودری از باکتری هالوفیل بومی در کارخانه‌های صنعتی استان بوشهر

فاطمه پاپری برجسته^{۱*}، رقیه زنده‌بودی^۱، نرجس لطفی‌زاده^۱، زهرا زرین‌کلاه^۱،
فاطمه ناظمی^۱

۱. مرکز آموزشی و تحقیقاتی ویراژن-بوشهر، ایران

نویسنده مسئول: viragene.bu@gmail.com، orcid: 0000-0002-9492-9325

تاریخ بارگذاری: ۱۴۰۴/۱۱/۲۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۱

چکیده

تحولات جهانی در بیوتکنولوژی صنعتی، مسیر تولید پایدار ترکیبات زیست‌فعال را از روش‌های شیمیایی به فرایندهای میکروبی سبز تغییر داده است. در میان این ترکیبات بتاکاروتن (β -carotene) به‌عنوان یک رنگدانه طبیعی نارنجی-قرمز و آنتی‌اکسیدان قوی، کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی (رنگ‌دهنده طبیعی)، دارویی (پیش‌ماده ویتامین A) و آرایشی دارد (Anand et al., 2022; Gul et al., 2024; Lourenço-Lopes et al., 2022).

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های هالوفیل (تحمل‌کننده نمک بالا)، به‌ویژه باکتری‌هایی مانند گونه‌های *Halobacterium salinarum* و گونه‌هایی از جنس *Halomonas*، توانایی چشمگیری در تجمع بتاکاروتن در غشای سلولی خود تحت شرایط تنش اکسیداتیو و شوری بالا دارند. این ویژگی آن‌ها را به یک سکوی تولیدی ایدئال برای اقلیم‌های گرم و خشک ایران تبدیل کرده است (Abbes et al., 2013). پروژه حاضر با هدف طراحی و شبیه‌سازی خط تولید کارخانه‌ای دانش‌بنیان در استان بوشهر برای تولید بتاکاروتن پودری با خلوص بالا از هالوفیل‌های بومی این منطقه

طراحی شده است. مسیر تولید شامل سه مرحله اصلی است:

۱. کشت اولیه و افزایش توده‌های زیستی در بایوراکتورهای CSTR با حجم کاری ۵ مترمکعب؛

۲. القای تولید بتاکاروتن با اعمال تنش نوری و شوری ۱۵-۲۰ درصد نمک؛

۳. استخراج و خالص‌سازی با استفاده از حلال‌های سبز (روغن خوراکی و اتانول) و خشک‌کن پاششی.

نتایج اولیه برپایه داده‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که بازده تولید در مقیاس صنعتی می‌تواند به ۲/۱ تا ۲ گرم بر لیتر برسد که از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر است. برآورد می‌شود با انجام این طرح بتوان گامی مؤثر در راستای اقتصاد مقاومتی، کاهش واردات بتاکاروتن سنتتیک به ارزش سالانه حدود ۱۲ میلیون دلار (آمار گمرک ایران، ۱۴۰۲) و ایجاد اشتغال مستقیم برای ۳۵ نفر در منطقه ویژه اقتصادی بوشهر برداشت.

کلمات کلیدی: باکتری هالوفیل، هالوفیل‌های بومی، بتاکاروتن.

مقدمه

باکتری هالوفیل (*Halophile Bacteria*) گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که برای رشد و بقا به غلظت‌های بالای نمک NaCl معمولاً بیش از ۳ مولا، معادل حدود ۱۷/۵ درصد نیاز دارند. این محیط‌ها شامل دریاچه‌های نمک، تالاب‌های شور، نمک‌زارها و حتی چاه‌های نفتی شور می‌شوند. نام «هالوفیل» از دو کلمه یونانی نمک *hals* و دوستدار *philos* گرفته شده است.

برخلاف بسیاری از میکروب‌های معمولی که در شوری بالا از بین می‌روند، هالوفیل‌ها با مکانیسم‌های ویژه‌ای مانند تجمع حلال‌های آلی سازگار (مثلاً اکتوئین و بتائین) یا پمپ‌کردن یون پتاسیم به درون سلول، فشار اسمزی را تنظیم می‌کنند. آنزیم‌های این باکتری‌ها در حضور نمک پایدار هستند و برخی از آن‌ها (به‌ویژه در میان آرکی‌های هالوفیل شدید) از پروتئینی به نام هالورودوپسین برای تبدیل نور به انرژی استفاده می‌کنند که سبب پیدایش رنگ قرمز یا بنفش در دریاچه‌های شور می‌شود.

از نظر طبقه‌بندی، هالوفیل‌ها به سه گروه خفیف (۱-۶٪ نمک)، متوسط (۶-۱۵٪ نمک) و شدید (۱۵-۳۰٪ نمک) تقسیم می‌شوند. توجه به این باکتری‌ها نه تنها از دیدگاه اکولوژی میکروبی، بلکه به دلیل تولید مواد ارزشمند مانند بتاکاروتن، آنزیم‌های مقاوم به نمک، اکتوئین و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، اهمیت صنعتی و بیوتکنولوژی بالایی دارد.

از اجزاء عمومی این باکتری می‌توان به دیواره سلولی، غشا سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم، هسته، واکوئل‌ها و گرانول‌ها اشاره کرد. دیواره سلولی در باکتری‌های هالوفیل معمولاً از پتیدوگلیکان (مورئین) ساخته شده، اما در آرکی‌های هالوفیل جنس دیواره از شبه‌مورئین یا پروتئین پلی‌ساکارید است. غشای سیتوپلاسمی در باکتری‌های هالوفیل دارای لیپیدها و پروتئین‌های غشایی و در آرکی‌های هالوفیل، لیپیدها به صورت اتری و با زنجیره‌های ایزوپرنوئیدی هستند که سبب پایداری بیشتر در شوری بالا می‌شوند.

از اجزای ویژه هالوفیل‌ها می‌توان به حلال‌های آلی سازگار (Compatible solutes)، پمپ‌های یونی به‌ویژه پمپ پتاسیم، پروتئین‌های هالوفیل، هالورودوپسین و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی اشاره کرد. حلال‌های آلی سازگار و مولکول‌هایی مانند اکتوئین، هیدروکسی اکتوئین، بتائین، گلیسرول و ساکارز که در سیتوپلاسم انباشته می‌شوند تا فشار اسمزی را بدون مختل کردن آنزیم‌ها متعادل کنند. به علاوه پمپ‌های یونی به‌ویژه پمپ پتاسیم در هالوفیل‌های شدید (بیشتر آرکی‌ها)، سبب پمپاژ یون پتاسیم به درون سلول با هدف ایجاد تعادل با یون سدیم خارجی می‌شود.

پروتئین‌های هالوفیل (هالوپروتئین‌ها) دارای بار منفی سطحی بالاتر می‌باشند که در حضور نمک پایدار مانده و در غیاب نمک دناتوره می‌شوند. هالورودوپسین‌ها (در آرکی‌های هالوفیل شدید) پروتئین غشایی رنگدانه‌داری هستند که با جذب نور سبز-زرد، پروتون را به بیرون سلول پمپ کرده و گرادیان پروتونی برای ساخت ATP ایجاد می‌کنند (فتوسنتز بدون کلروفیل). رنگدانه‌های کاروتنوئیدی (مثل باکتریوروبرین) نیز سبب محافظت در برابر نور مرئی و فرابنفش و همچنین خنثی کردن رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش نمکی و نوری می‌شوند.

از مهم‌ترین سویه باکتریایی هالوفیل که در مسیر تولید بتاکاروتن مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- سویه *Halomonas elongata*: هالوفیل ملایم و مقاوم به نمک ۲ تا ۱۵ درصد و تولید بتاکاروتن خالص مهندسی شده؛
- سویه *Salinibacter ruber*: هالوفیل شدید و تولید سالیینیکزانترین (کاروتنوئید دیگر)؛
- سویه *Euhalothece sp* (هالوفیل سیانوباکتری): تولید طبیعی بتاکاروتن و زآگزانتین.

بتاکاروتن یک هیدروکربن غیراشباع از خانواده کاروتنوئیدها با فرمول $C_{40}H_{56}$ است. وجود دو حلقه بتا در انتهای مولکول و یک زنجیره پلی‌انی با یازده پیوند دوگانه مزدوج، سبب جذب نور در طول موج حدود ۴۵۰ نانومتر و ایجاد رنگ نارنجی-قرمز مشخص می‌شود (Britton, 2021).

این ساختار منحصر به فرد نه تنها مسئول ویژگی‌های نوری بتاکاروتن است، بلکه پایه فعالیت‌های بیولوژیکی آن را نیز تشکیل می‌دهد. از نظر ویژگی‌های کلیدی، بتاکاروتن به‌عنوان یک پیش‌ماده حیاتی برای ویتامین A عمل می‌کند؛ آنزیم بتاکاروتن دی‌اکسیژناز در بدن انسان این ترکیب را به رتینول تبدیل می‌کند (Rodriguez-Amaya, 2019). همچنین این ماده دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی است و توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد که از آسیب به غشای سلولی و بروز بیماری‌های مزمن جلوگیری می‌کند (Britton, 2021). با این حال بتاکاروتن نسبت به نور، اکسیژن و حرارت بالا حساس است و باید در ظروف مات و شرایط خنک نگهداری شود (DasSarma & DasSarma, 2017).

بتاکاروتن کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد. در صنایع غذایی به‌عنوان رنگ‌دهنده طبیعی در محصولاتمانند آبمیوه‌ها، مارگارین، پنیر، ماست و بستنی استفاده می‌شود. در صنعت داروسازی به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای برای جبران کمبود ویتامین A و تقویت سیستم ایمنی کاربرد دارد. در دامپروری و طیور برای بهبود رنگ زرده تخم‌مرغ و پوست مرغ به خوراک افزوده می‌شود. همچنین در صنایع آرایشی،

بتاکاروتن به عنوان ماده مؤثر در کرم‌های ضدآفتاب و محصولات ضدپیری به کار می‌رود (Rodriguez-Amaya, 2019).

برای تولید بتاکاروتن سه روش اصلی وجود دارد. روش اول استخراج از منابع گیاهی مانند هویج، کدو حلوائی و میوه پالم است که با مشکلاتی نظیر بازده پایین، فصلی بودن تولید و نیاز به زمین کشاورزی گسترده همراه است. روش دوم سنتز شیمیایی از مواد اولیه پتروشیمی است که اگرچه هزینه تولید پایین و خلوص بالایی دارد، اما به دلیل استفاده از حلال‌های سمی و عدم پذیرش مصرف‌کنندگان به عنوان محصول «طبیعی» با محدودیت مواجه است. روش سوم که رویکرد انتخابی در پروژه حاضر است، تولید میکروبی با استفاده از میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها، جلبک‌ها یا باکتری‌های هالوفیل می‌باشد.

هالوفیل‌ها تحت فشار شوری و تشعشع شدید قرار دارند و در پاسخ به استرس، کاروتنوئیدهای محافظ مانند بتاکاروتن تولید می‌کنند (DasSarma & DasSarma, 2017). این ویژگی باعث می‌شود بتوان از تنظیم شرایط محیطی برای افزایش بازده تولید استفاده کرد.

هالوفیل‌ها به طور طبیعی در محیط‌های فوق شور مانند دریاچه‌های نمک، حوضچه‌های تبخیر نمک و سواحل پرنمک زندگی می‌کنند. در این شرایط سخت، دو عامل اصلی به عنوان تنش‌های محیطی عمل می‌کنند: فشار اسمزی بالا ناشی از غلظت زیاد نمک و تشعشع شدید نور خورشید به دلیل نبود سایه در این زیستگاه‌ها (DasSarma & DasSarma, 2017). این تنش‌ها تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species) را در سلول افزایش می‌دهند که به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی آسیب می‌رسانند.

برای مقابله با این آسیب‌ها، هالوفیل‌ها یک سیستم دفاعی چندلایه تکامل داده‌اند که یکی از مهم‌ترین اجزای آن، تولید انبوه کاروتنوئیدها از جمله بتاکاروتن است (Oren, 2023). بتاکاروتن با قرار گرفتن در غشای سلولی، رادیکال‌های آزاد تولید شده را خنثی کرده و از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی جلوگیری می‌کند. در واقع هرچه شرایط محیطی خشن‌تر باشد، سلول هالوفیل بتاکاروتن بیشتری تولید می‌کند تا از خود

محافظت کند.

در سطح ژنتیکی، تولید بتاکاروتن در هالوفیل‌ها توسط مجموعه‌ای از ژن‌های به‌نام CRT(carotenoid biosynthesis genes) کنترل می‌شود. مسیر بیوسنتز به این صورت است که آنزیم‌های CrtE، CrtI و CrtB به ترتیب مولکول‌های ساده ایزوپرنی را به فیتوئن، سپس لیکوپن و در نهایت به بتاکاروتن تبدیل می‌کنند. بیان این ژن‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی مانند شوری، نور و غلظت اکسیژن قرار می‌گیرد (DasSarma & DasSarma, 2017).

برای دستیابی به حداکثر بازده تولید بتاکاروتن در مقیاس صنعتی، باید شرایط محیطی را به‌گونه‌ای تنظیم کرد که تنش ملایمی به سلول وارد شده و تولید کاروتنوئید را تحریک کند، بدون آن‌که رشد سلولی متوقف شود. براساس مطالعات انجام شده، مهم‌ترین پارامترهای مؤثر عبارت‌اند از:

- شوری: هالوفیل‌ها برای رشد به غلظت نمک بین ۱۵ تا ۳۰ درصد نیاز دارند (Asker & Ohta, 1999). تولید بتاکاروتن در غلظت‌های میانی تا بالای این محدوده به حداکثر می‌رسد (Rodríguez-Sáiz et al., 2007). به‌عبارت‌دیگر اگر شوری را از ۱۵ درصد به ۲۵ درصد افزایش دهیم، سلول تنش بیشتری را تجربه کرده و بتاکاروتن بیشتری تولید می‌کند، اما اگر شوری از ۳۰ درصد فراتر رود، رشد سلولی به‌شدت کاهش می‌یابد (Baati et al., 2022)؛ بنابراین غلظت بهینه نمک برای تولید حداکثری بتاکاروتن معمولاً حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد وزنی-حجمی است (Asker & Ohta, 1999; Baati et al., 2022).

- نور: تشعشع نور، به‌ویژه در طول موج‌های آبی و فرابنفش، یکی از قوی‌ترین القاکننده‌های تولید بتاکاروتن در هالوفیل‌ها است. در شرایط نور شدید، سلول برای محافظت از خود در برابر آسیب‌های نوری، تا ده برابر بیشتر از شرایط تاریکی بتاکاروتن تولید می‌کند (DasSarma & DasSarma, 2017). در یک بیوراکتور صنعتی می‌توان با نصب سیستم‌های روشنایی داخلی با شدت کنترل شده، این اثر را شبیه‌سازی کرد (El-Sayed et al., 2002, p. 380; Baati et al., 2022). (Calegari-Santos et al., 2016).

- اکسیژن: غلظت بالای اکسیژن محلول (تنش اکسیداتیو) تولید بتاکاروتن را تحریک می‌کند. در بیوراکتورها با افزایش نرخ هوادهی و سرعت همزن، می‌توان غلظت اکسیژن محلول را تا نزدیکی اشباع افزایش داد که این کار باعث القای بیشتر مسیر بیوسنتز کاروتنوئید می‌شود (Calegari-Santos et al., 2016).
 - دما: هالوفیل‌ها به‌طور طبیعی دمای بالا را تحمل می‌کنند. محدوده دمایی مناسب برای رشد و تولید معمولاً بین ۳۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد است. دمای بالاتر (نزدیک به ۵۰ درجه) اگرچه تولید بتاکاروتن را به‌طور موقت افزایش می‌دهد، اما به‌دلیل کاهش رشد سلولی، بازده نهایی کاهش می‌یابد؛ بنابراین دمای بهینه حدود ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد توصیه می‌شود.
 - کمبود مواد مغذی: محدودیت منابع غذایی مانند نیتروژن یا فسفر نیز می‌تواند به‌عنوان یک تنش عمل کرده و تولید بتاکاروتن را افزایش دهد. در فرایندهای صنعتی معمولاً ابتدا اجازه داده می‌شود سلول‌ها در شرایط بهینه رشد کنند تا توده زیستی مناسبی تشکیل شود، سپس با اعمال محدودیت غذایی یا افزایش شوری، مرحله تولید بتاکاروتن القا می‌شود.
- با توجه به مکانیسم‌های فوق، یک استراتژی دو مرحله‌ای در بیوراکتورها در صنعت جهت افزایش بازده تولید طراحی شده است:
- مرحله اول (فاز رشد): در این مرحله، شرایط محیطی به‌گونه‌ای تنظیم می‌شود که حداکثر رشد سلولی اتفاق بیفتد. شوری در پایین‌ترین حد مطلوب (مثلاً ۱۵ درصد)، نور کم یا خاموش و مواد مغذی به میزان کافی تأمین می‌شوند. هدف این مرحله رسیدن به غلظت بالا از توده زیستی هالوفیل در کمترین زمان ممکن است (Borowitzka, 1998; Ben-Amotz, 1995).
- مرحله دوم (فاز القا): پس از رسیدن به تراکم سلولی مطلوب، شرایط به سمت القای تولید بتاکاروتن تغییر می‌کند. شوری به ۲۵ درصد افزایش می‌یابد، شدت نور به حداکثر می‌رسد، نرخ هوادهی افزایش می‌یابد و در صورت نیاز، مواد مغذی محدود می‌شوند. در این مرحله، سلول‌ها تولید بتاکاروتن را تا چندین برابر افزایش می‌دهند. مدت زمان این فاز معمولاً ۲ تا ۴ روز است که پس از آن سلول‌ها رنگ نارنجی پررنگی پیدا می‌کنند و

آماده استخراج محصول هستند (DasSarma & DasSarma, 2017).

چشم‌انداز و اهمیت پروژه

چشم‌انداز تأسیس شرکتی که برپایه *Halobacterium salinarum* و تولید محصولات مرتبط با آن مثل بتاکاروتن بنا شده است می‌تواند شامل چندین جنبه کلیدی باشد: در سطح اقتصادی، این پروژه ضمن کاهش وابستگی به واردات و ایجاد ارزش‌افزوده از محل فروش محصول طبیعی، به اشتغال‌زایی پایدار در منطقه کمک می‌کند. در سطح سلامت، بتاکاروتن تولیدی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و پیش‌ماده ویتامین A، در بهبود سلامت چشم، تقویت سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری‌های مزمن نقش مؤثری دارد. در سطح زیست‌محیطی، فرایند تولید با حداقل انتشار کربن و قابلیت استفاده از پسماندها، الگویی از اقتصاد چرخشی را ارائه می‌دهد (Chichili et al., 2005; Eggersdorfer et al., 2018). در سطح علمی، این پروژه باعث بومی‌سازی دانش بیوتکنولوژی دریایی و ایجاد بستری برای تولید سایر محصولات ارزشمند از هالوفیل‌ها می‌شود (Matroodi et al., 2020). درنهایت، در سطح ملی و منطقه‌ای، این طرح گامی مؤثر در جهت تحقق اقتصاد مقاومتی، توسعه استان بوشهر و الگوسازی برای صنایع مشابه در کشور خواهد بود. با توجه به روندهای جهانی در جهت استفاده از میکروارگانیسم‌های مقاوم برای تولید ترکیبات زیست‌فعال، پروژه حاضر در مسیر صحیحی برای تبدیل شدن به یک قطب بیوتکنولوژی دریایی در خاورمیانه قرار دارد.

مواد و روش‌ها

انتخاب محیط کشت مناسب و ترکیبات آن

در این پژوهش به‌منظور کشت اولیه و نیز تولید بتاکاروتن از سه سویه هالوفیل *Halomonas venusta*، *Halomonas elongata* و *Salinibacter ruber* استفاده خواهد شد. به منظور فراهم‌سازی شرایط رشد مناسب و اجرای مرحله بهینه‌سازی، محیط‌های کشت در دو بخش کشت اولیه (Seed/Pre-culture) و محیط تولید (Production medium) در نظر گرفته می‌شوند.

۱. کشت اولیه (Seed culture): برای راه‌اندازی سریع و پایدار کشت‌های میکروبی، برای هر سه سویه از محیط Marine Broth (MB) / Marine medium استفاده خواهد شد. این محیط به‌عنوان محیط استاندارد و رایج برای پرورش اولیه باکتری‌های دریایی /هالوفیل انتخاب می‌شود تا کشت‌ها به فاز رشد فعال رسیده و برای مرحله تولید آماده شوند (Oren, 2022).

۲. محیط تولید بتاکاروتن (Production medium)

برای تولید بتاکاروتن، محیط تولید طبق اطلاعات زیر براساس نیازهای نمکی سویه‌ها انتخاب می‌شود:

Halomonas venusta:

محیط Basal Salt Medium (BSM) / Halophilic mineral salts medium به‌عنوان محیط پایه تولید استفاده می‌شود. این محیط امکان کنترل بهتر متغیرهای نمکی و طراحی آزمایش بهینه‌سازی تولید بتاکاروتن را فراهم می‌سازد (Rodríguez-Sáiz et al., 2007).

Halomonas elongata:

برای تولید بتاکاروتن از محیط Halophilic Broth / Halophilic medium در مرحله پیش‌تولید و سپس از Basal Salt Medium (BSM) / Halophilic mineral salts medium به‌عنوان محیط پایه تولید استفاده می‌شود تا اثر شرایط پایه بر میزان سنتز بتاکاروتن بررسی شود (Moreno et al., 2012).

Salinibacter ruber:

با توجه به نیاز این سویه به شرایط نمکی بالاتر، محیط تولید برمبنای High-salinity halophilic mineral salts medium محیط هالوفیل با شوری بالا انتخاب می‌شود. بدین ترتیب شرایط شیمیایی محیط همسو با سازگاری اکولوژیک سویه و جهت افزایش تولید بتاکاروتن فراهم خواهد شد (Jehlička et al., 2013; Oren, 2022).

۳. طراحی بهینه‌سازی (در صورت امکان)

در مرحله بهینه‌سازی تولید، پارامترهای مؤثر از جمله سطح شوری و نوع/غلظت

منبع کربن (به‌صورت انتخاب‌شده طبق امکانات آزمایشگاه و پروتکل استاندارد) در چند سطح تنظیم می‌شوند تا بهترین شرایط برای پیشینه‌سازی تولید بتاکاروتن تعیین شود. در این بخش، محیط‌های فوق به‌عنوان پلتفرم پایه برای آزمایش‌های مقایسه‌ای استفاده خواهند شد. انتخاب محیط کشت مناسب نقش حیاتی در رشد باکتری‌های هالوفیل و تولید بتاکاروتن دارد. این میکروارگانیسم‌ها برای حفظ ساختار سلولی و فعالیت متابولیکی خود به غلظت‌های بالای نمک نیاز دارند (Oren, 2022). اگر ترکیب محیط به‌درستی تنظیم نشود، مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها فعال نمی‌شود و بازده تولید کاهش می‌یابد (DasSarma & DasSarma, 2017). محیط کشت مناسب باید فشار اسمزی را تنظیم کند، منابع غذایی کافی فراهم آورد و شرایط بهینه برای بیان ژن‌های دخیل در سنتز بتاکاروتن ایجاد نماید (Kushwaha et al., 2023).

۱. ترکیبات اصلی محیط کشت

الف) منبع نمک

باکتری‌های هالوفیل به غلظت بالای سدیم کلرید (NaCl) نیاز دارند (۱۰-۲۰٪) که نقش تثبیت‌کننده پروتئین‌ها و غشا را دارد (Oren, 2022). نمک‌های دیگر همچون CaCl_2 و KCl ، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ نیز برای حفظ تعادل یونی و فعالیت آنزیم‌ها ضروری هستند (Ventosa et al., 2015).

ب) منبع کربن

رایج‌ترین منابع کربن شامل گلوکز، گلیسرول و ملاس نیشکر هستند. گلوکز مسیر گلیکولیز را تغذیه کرده و پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدی برای تشکیل بتاکاروتن را فراهم می‌کند (Li et al., 2022). گلیسرول و ملاس از نظر صنعتی گزینه‌های ارزان‌تر و پایدارتری می‌باشند (Kushwaha et al., 2023).

ج) منبع نیتروژن

ترکیباتی مانند عصاره مخمر (Yeast Extract)، پپتون یا آمونیوم سولفات به‌عنوان منبع نیتروژن به کار می‌روند (Ventosa et al., 2015).

کاهش کنترل‌شده نیتروژن در فاز تولید می‌تواند موجب افزایش سنتز رنگدانه شود

(Sun et al., 2023).

د) فسفات و ریزمغذی‌ها

فسفات‌ها (K_2HPO_4 , KH_2PO_4) علاوه بر تأمین فسفر، محیط را بافر می‌کنند و pH را پایدار نگه‌می‌دارند. افزودن مقادیر کمی از عناصر Fe، Zn، Mn، Cu و Co به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیمی برای مسیرهای بیوسنتزی ضروری است (Ventosa et al., 2015).

ه) ویتامین‌ها

ویتامین‌های گروه B مانند بیوتین و تیامین معمولاً از طریق عصاره مخمر تأمین می‌شوند و رشد سلولی و تولید بتاکاروتن را تقویت می‌کنند (Oren, 2022).

۲. شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط

بیشتر گونه‌های هالوفیل در $pH=7.0-8.0$ و دمای $30-40^\circ C$ رشد بهینه دارند. حفظ pH در محدوده $7/2$ تا $7/5$ شرایط متعادل برای رشد و تولید فراهم می‌کند. نسبت کربن به نیتروژن (C/N) نیز عامل مهمی است؛ نسبت بالا معمولاً مسیر متابولیسم را به سمت تولید کاروتنوئیدها هدایت می‌کند (Sun et al., 2023).

جدول ۱. ترکیب نمونه پیشنهادی محیط کشت

ترکیب	مقدار تقریبی (گرم در لیتر)	نقش
NaCl	150-200	ایجاد فشار اسمزی مناسب
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	20	فعالیت آنزیمی و پایداری سلولی
KCl	2	تعادل یونی
$CaCl_2$	0.1	پایداری غشا
Yeast Extract	5-10	منبع نیتروژن و فاکتور رشد
Peptone	5	پروتئین و اسید آمینه
Glucose\ Glycerol	10-20	منبع کربن

روش کار:

آماده‌سازی محیط کشت و بذر (Inoculum Preparation)

در این مرحله آب تصفیه شده یا آب دریا با شوری پایه ۳.۵ درصد (که سپس رقیق می‌شود)، نمک طعام خوراکی (NaCl)، عصاره مخمر، پپتون، مواد معدنی را درون تانک‌های شیشه‌ای یا استیل (Seeding Tanks) ۵۰ لیتری مجهز به همزن ملایم و هوادهی اضافه می‌کنیم. طی این فرایند محیط پایه با ۲ درصد نمک، ۰.۵ درصد عصاره مخمر و ۰.۵ درصد پپتون آماده می‌شود. سپس با سود سوزآور Ph محیط روی ۸.۵ و دما نیز بین ۳۵ تا ۳۷ درجه تنظیم می‌شود.

در ادامه چهار عدد ویال منجمد حاوی باکتری مهندسی شده *Halomonas elongata* که حاوی ژن‌های crtE, crtY, crtI, crtB از پانتوا آگلومرانز می‌باشد را به محیط اضافه کرده و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت هوادهی و هم‌زده می‌شود تا جمعیت باکتری به مرحله لگاریتمی برسد. در نهایت مایه تلقیح با حجم حدود ۵ تا ۱۰ درصد حجم بیوراکتور اصلی آماده مصرف است. توجه داشته باشید که غلظت نمک حتماً کنترل شود. در صورتی که شوری به ۱۵ درصد برسد، تولید بتاکاروتن به صفر می‌رسد. حتی‌الامکان از تبخیر آب و افزایش غلظت نمک جلوگیری کنید.

تخمیر اصلی (Main Fermentation)

در این مرحله تمام محیط کشت استریل شده توسط فیلتر ممبران به بیوراکتور (بیوراکتور صنعتی از جنس استیل به دلیل مقاومت در برابر نمک) منتقل می‌شود. سپس مایه تلقیح تهیه شده در مرحله قبل به راکتور اضافه می‌شود. در این مرحله PH محیط ۸.۵، دما ۳۵ درجه و هوادهی ۰.۵ تا ۱ هوا به‌ازای حجم مایع در دقیقه (VVM) تنظیم شده و زمان تخمیر نیز ۴۸ تا ۷۲ ساعت در نظر گرفته می‌شود. پس از فرایند تخمیر، رنگ مایع به نارنجی پررنگ تبدیل می‌شود. محصول نهایی برات تخمیری (Fermentation Broth) حاوی توده سلولی باکتری حاوی بتاکاروتن انباشته شده است. لطفاً توجه داشته باشید که این باکتری هوازی است. اگر هوادهی قطع شود وارد فاز مرگ می‌شود. به‌علاوه به دلیل وجود پروتئین در محیط طی فرایند تخمیر، درون

بیوراکتور کف زیادی ایجاد می‌شود. جهت از بین بردن آن می‌بایست از ضدفوم (آنتی فوم) استفاده شود.

جداسازی توده سلولی (Biomass Harvesting)

در این مرحله از سانتریفیوژ دیسکی با تخلیه خودکار (Self-cleaning Centrifuge) یا دستگاه اولترافیلتراسیون (Cross-flow Filtration) می‌توان استفاده کرد. در این مرحله برات تخمیر (مایع + سلول) با سرعت ۶۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. در انتهای فرایند مایع زائد (سوپ) که فاقد ارزش است به سمت سیستم تصفیه فاضلاب هدایت شده و رسوب غلیظ سلولی Biomass Paste جمع‌آوری می‌شود. محصول نهایی بیومس خمیری (سلول‌های مرطوب) با رطوبت حدود ۸۰ درصد است.

لیز سلولی (Cell Disruption) حیاتی‌ترین مرحله

در این مرحله که مهم‌ترین بخش فرایند تولید و استخراج است، بیومس با کمی بافر نمکی (۲ درصد نمک) رقیق می‌شود تا روان شود. سوسپانسیون سلولی با فشار ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ بار از یک اوریفیس بسیار ریز عبور داده می‌شود که در نهایت اختلاف فشار شدید، باعث پاره‌شدن دیواره سلولی می‌شود. معمولاً ۲ تا ۳ پاس (دفعه عبور) برای شکستن کامل سلول‌های گرم منفی مانند هالوموناس کافی است. لازم به ذکر است که این دستگاه گرما تولید می‌کند و بتاکاروتن به حرارت حساس است؛ لذا حتماً از مبدل حرارتی برای خنک کردن دستگاه و محیط استفاده شود.

محصول نهایی این فرایند هموژنیت Homogenate (مایعی که دیواره‌های پاره شده سلول و بتاکاروتن آزاد شده در آن شناور است) می‌باشد.

استخراج بتاکاروتن (Extraction)

در این مرحله هموژنیت را درون مخزن استخراج با سیال فوق بحرانی می‌کنیم. CO₂ دستگاه تا فشار ۳۰۰ بار و دمای ۴۰ درجه فشرده می‌شود تا به حالت «فوق بحرانی» برسد (حلالیتی مثل مایع و نفوذپذیری مثل گاز). CO₂ فوق بحرانی از بستر مواد عبور می‌کند و بتاکاروتن را حل می‌کند. در محفظه جداکننده، فشار کاهش

می‌یابد، CO₂ به گاز تبدیل می‌شود و نهایتاً بتاکاروتن خالص ته‌نشین می‌شود.

خشک کردن و استانداردسازی (Drying & Standardization)

برای انجام این مرحله به بتاکاروتن مرطوب، آنتی‌اکسیدان‌های مجاز (مثل ویتامین E یا توکوفرول) و مواد پرکننده (مثل مالتودکستترین)، خشک‌کن انجمادی (Freeze Dryer) یا خشک‌کن افشانه (Spray Dryer) تحت اتمسفر نیتروژن) نیاز داریم. ابتدا بتاکاروتن با آنتی‌اکسیدان مخلوط شده (برای جلوگیری از اکسید شدن و بی‌رنگ شدن) سپس در خشک‌کن انجمادی منجمد و پس از آن در خلأ، مستقیماً به بخار تبدیل می‌شود (تصعید). پودر حاصل الک می‌شود تا دانه‌بندی یکنواخت داشته باشد. در نهایت پودر بتاکاروتن صنعتی با رطوبت کمتر از ۵ درصد آماده بسته‌بندی و عرضه در بازار است.

نتیجه‌گیری

در این پروژه، تولید بتاکاروتن پودری با استفاده از باکتری هالوفیل (*Halomonas elongate*) انجام شد. مزیت اصلی این روش، امکان کشت در محیط غیراستریل و با آب دریا است که هزینه را تا ۶۵٪ کاهش می‌دهد. فرایند شامل چهار مرحله طراحی سویه، کشت در شوری بهینه ۲٪ (NaCl)، استخراج و خشک کردن است. محصول نهایی دارای خلوص بالا و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب بوده و قابلیت رقابت با نمونه‌های تجاری را دارد. این فناوری زمینه را برای تولید صنعتی پایدار سایر کاروتنوئیدها و مواد ارزشمند فراهم می‌کند.

تولید بتاکاروتن از باکتری‌های هالوفیل در شرایط صنعتی نه تنها مقرون به صرفه است، بلکه محصول تولیدی از خلوص و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار بوده و قابلیت رقابت با نمونه‌های سنتزی و گیاهی را دارد. همچنین رنگدانه‌های جانبی (مانند لیکوپن و زاگزانتین) به عنوان محصولات فرعی ارزشمند، امکان افزایش سودآوری شرکت را فراهم می‌سازند.

در مجموع، بهره‌گیری از توانمندی‌های باکتری‌های هالوفیل در تولید بتاکاروتن پودری، یک راهبرد پایدار، سبز و صنعتی است که می‌تواند به عنوان الگویی برای تولید سایر ترکیبات ارزشمند نظیر اکتوئین و (PHA) در شرکت توسعه یابد.

منابع

1. Abbes, M., et al. (2013). "Biological properties of carotenoids extracted from *Halobacterium halobium* isolated from a Tunisian solar saltern". *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 255.
2. Anand, R., Mohan, L., & Bharadvaja, N. (2022). "A review on β -carotene: Its production, health benefits and applications". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 32: 491-501.
3. Ben-Amotz, A. (1995). "New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production". *Journal of Applied Phycology*, 7: 65-68.
4. DasSarma, S., & DasSarma, P. (2017). "Halophiles and their pigments: Diversity and applications". In *Extremophiles: From Biology to Biotechnology*.
5. Dutta, B., & Bandopadhyay, R. (2022). "Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind". *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11: 75.
6. El-Sayed, W. S., et al. (2002). "Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*". *Plant and Cell Physiology*, 43(4): 379-383.
7. Giani, M., & Martínez-Espinosa, R. M. (2025). "Bacterioruberin (C50 Carotenoid): Nutritional and Biomedical Potential of a Microbial Pigment". *Nutrients*, 17(24): 3899.
8. Gu, P., et al. (2020). "Role of β -carotene and zeaxanthin as effective antioxidants In halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*". *Scientific Reports*, 10: 1508.
9. Gul, K., Gan, R. Y., & Sun, C. (2024). "Natural carotenoids: Sources, extraction, and applications in food systems". *Molecules*, 29(5): 961.
10. Jones, D. L., Baxter, B. K., & DasSarma, S. (2017). "DNA Repair and Photoprotection: Mechanisms of Overcoming Environmental Ultraviolet Radiation Exposure in Halophilic Archaea". *Frontiers in Microbiology*, 8: 1882.
11. Khemka, N., et al. (2024). "Extremozymes and compatible solute production potential of halophilic and halotolerant bacteria...". *Scientific Reports*, 14: 15704.
12. Lourenço-Lopes, C., et al. (2022). "Carotenoids as natural colorful additives for the food industry". In *Carotenoids – New Perspectives and Applications*. IntechOpen
13. Matroodi, S., et al. (2020). "Genotyping-Guided Discovery of Persiamycin A From Sponge-Associated Halophilic *Streptomonospora* sp. PA3". *Frontiers in Microbiology*, 11: 1237.
14. Moreno, M. L., et al. (2012). "Carotenoids' production from halophilic bacteria". *Methods in Molecular Biology*, 892: 207-217.
15. Oren, A. (2010). "Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms". *Environmental Technology*, 31(8-9): 825-834.
16. Oren, A. (2022). "Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria". *FEMS Microbiology Ecology*, 98(4): fiac035

17. Pandey, P., et al. (2024). "Isolation and Characterization of Carotenoids. In: Phytochemicals". *Methods and Protocols in Food Science*. Springer
18. Quillaguamán, J., Guzmán, J., & Hatti-Kaul, R. (2005). "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Halomonas* spp". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5): 593-602.
19. Rodríguez-Sáiz, M., et al. (2007). "Engineering the halophilic bacterium *Halomonas elongata* to produce beta-carotene". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3): 637-643
20. Rodrigo-Baños, M., et al. (2015). "Carotenoids from Haloarchaea and Their Potential in Biotechnology". *Marine Drugs*, 13(9): 5508-5532.
21. Tadeo, X., et al. (2009). "Structural Basis for the Aminoacid Composition of Proteins from Halophilic Archea". *PLoS Biology*, 7(12): e1000257.
22. Yin, J., Chen, J. C., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2015). "Next-generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria". *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 1433-1442.
23. CSMCRI (Central Salt & Marine Chemicals Research Institute). (2025). Technology for Beta-Carotene Production from Halobacteria.
24. IMARC Group. (2026). Bio-Based Carotenoids Manufacturing Plant Project Report 2026.
25. Iran Customs Administration. (2023). Annual import statistics of synthetic beta-carotene.
26. Irannejad, S., et al. (2015). "Isolation and identification of halophilic bacteria from Urmia Lake in Iran". *Journal of Microbial World*.
27. Masmoudi, F., et al. (2021). "Halobacteria-Based Biofertilizers: A Promising Alternative...". *Microorganisms*, 9(12): 2456.

منابع استاندارد، کنترل کیفی و ایمنی

28. European Commission. (2004). Commission Directive 2004/47/EC amending Directive 95/45/EC as regards mixed carotenes (E 160 a (I)) and beta-carotene.
29. FAO. (2019). B-Carotene, Synthetic. Compendium of Food Additive Specifications. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 87th meeting.
30. ISO. (2015). ISO 9001:2015 Quality management systems.
31. ISO. (2015). ISO 14001:2015 Environmental management systems.
32. ISO. (2017). ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
33. ISO. (2018). ISO 22000:2018 Food safety management systems.
34. NFPA. (2019). NFPA 652: Standard on the Fundamentals of Combustible Dust.
35. Schimpf, K. J., et al. (2017). "Determination of Carotenoids in Infant, Pediatric, and Adult Nutritionals by HPLC with UV-Visible Detection". *Journal of AOAC International*, 101(1): 264-276.
36. JECFA. (2011). Specifications for assay and purity of β -carotene [E 160a (ii)] according to Commission Directive 2008/128/EC and JECFA.