ผลของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก

วนิดา ปานอุทัย[1*]
กฤติน จุลนารา[2]
จุฑามาศ อินคล้าย[2]
จุฑาทิพย์ รวดเร็ว[2]
ณัฐวดี แก้วเกลื่อน[2]

[1]ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[*]ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล : ifrwdp@ku.ac.th
รับเมื่อ 16 เมษายน 2566 **แก้ไขเมื่อ** 3 กรกฎาคม 2566 **ตอบรับเมื่อ** 13 กรกฎาคม 2566

จุดเด่น

- การประยุกต์ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก
- ผลของกระบวนการหมักต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของสาหร่ายสไปรูลิน่า
- การเพิ่มมูลค่าชีวผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายสไปรูลิน่า

บทคัดย่อ

สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นแหล่งอาหารที่มีการผลิตในเชิงพาณิชย์และถูกจัดเป็นอาหารที่มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภคของมนุษย์ สาหร่ายสไปรูลิน่าได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง กรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมัน และสารรงควัตถุที่สำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่า *Spirulina platensis* IFRPD 1182 เป็นซับสเตรต (substrate) ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 พบว่า สาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแล็กติกได้ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสาหร่ายสไปรูลิน่าส่งผลให้มีปริมาณสารสำคัญไฟโคไซยานิน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น สามารถพัฒนาเป็นชีวผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าได้ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตร่วมกับสารอาหารอื่น เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแล็กติกและเพิ่มผลผลิตกรดแล็กติกต่อไปได้

คำสำคัญ : สาหร่ายสไปรูลิน่า แบคทีเรียแล็กติก กระบวนการหมัก ชีวผลิตภัณฑ์

Influence of *Spirulina* on lactic acid bacteria cultivation

Wanida Pan-utai[1*], Krittin Julnara[2], Juthamart Inkhlay[2], Jutatip Roudrew[2], and Nutthawadee Kaewkluean[2]

[1]Department of Applied Microbiology,
Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University
[2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University
*Corresponding author, e-mail : ifrwdp@ku.ac.th
Received 16 April 2023; **Revised** 3 July 2023; **Accepted** 13 July 2023

Highlights

- Application of *Spirulina* for lactic acid bacteria cultivation
- Effect of fermentation on bioactivities enhancement of *Spirulina*
- Bioproducts are value-added from *Spirulina*

Abstract

Spirulina platensis is produced commercially as a food source, and is considered safe for human consumption. It has attractively increasing interest due to its high protein content, essential amino acids, fatty acids, and pigments. Here, the potential of *Spirulina platensis* IFRPD 1182 biomass as a substrate for cultivation of lactic acid bacteria was evaluated. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 growth was supported by *Spirulina* biomass during fermentation. The increasing of *S. platensis* biomass could increase C-phycocyanin and total phenolic contents including antioxidant properties which could be developed as bioproducts. The results showed a guideline for applying *Spirulina* as a substrate with other nutrient sources that could support the growth of lactic acid bacteria and lactic acid production.

Keywords : *Spirulina*, lactic acid bacteria, fermentation, bioproducts

บทนำ

สาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina platensis*) จัดเป็นสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgae) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้รับความนิยมในกลุ่มผู้บริโภคอาหารเพื่อสุขภาพและได้รับความสนใจในเชิงพาณิชย์เพิ่มขึ้น โดยชีวมวลของสาหร่ายสไปรูลิน่ามีโปรตีนปริมาณสูง มีกรดอะมิโนจำเป็น กรดไขมัน และสารสีที่สำคัญ[1] จัดเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารอาหารหรือองค์ประกอบทางชีวเคมีที่ครบถ้วน จึงเป็นสาหร่ายที่ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ รวมทั้งมุมมองทางด้านการแพทย์[2] ชีวมวลของสาหร่ายขนาดเล็กเป็นแหล่งทรัพยากรที่ได้จากธรรมชาติและมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ได้แก่ อาหาร[3] ยา และโภชนเภสัช[4-5] มีศักยภาพช่วยในการรักษาโรค[6] เครื่องสำอาง[7] ไบโอดีเซลและก๊าซชีวภาพ[8] และการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ[9] การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่ามีการขยายการผลิตขนาดใหญ่ในเชิงพาณิชย์อยู่ทั่วโลก[10] ทั้งนี้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่ามีศักยภาพสูงต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าได้หลากประเภท รวมถึงการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลและไบโอมีเทน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนและกรดไขมันสูง[11] ได้แก่ การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลสาหร่าย *Scenedesmus dimorphus* ที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว[12] การผลิตชีวผลิตภัณฑ์จากชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กหรือชีวมวลสาหร่ายขนาดเล็กที่เหลือทิ้งโดยใช้กระบวนการหมักหรือกระบวนการย่อยด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพกำลังได้รับความสนใจ ดังผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อช่วยในการป้องกันโรคต่าง ๆ ได้แก่ การป้องกันโรคเบาหวาน การต้านไวรัส เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และสารต้านมะเร็ง รวมทั้งช่วยในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Lactobacilli*[13-14]

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกหรือกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแล็กติกเป็นวิธีการถนอมอาหารชนิดหนึ่ง เพื่อช่วยเพิ่มความปลอดภัย ยืดอายุการเก็บรักษา และเพิ่มคุณสมบัติทางโภชนาการของอาหารได้[15-16] อีกทั้งถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมประมาณร้อยละ 70 ในผลิตภัณฑ์อาหารระดับอุตสาหกรรม โดยผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ผักดอง นมเปรี้ยว เนื้อสัตว์ วัตถุกันเสีย เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก เชื้อเพลิงชีวภาพ และเภสัชภัณฑ์[17-18] แบคทีเรียแล็กติก (lactic acid bacteria, LAB) เป็นจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ เป็นจุลินทรีย์แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างแตกต่างกันในช่วง 5.5-5.8[19] โดยแบคทีเรียแล็กติกส่วนใหญ่ประกอบด้วยสายพันธุ์ *Lactobacillus Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragonococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella*[18] ปัจจุบันการใช้แบคทีเรียแล็กติกเพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและรูปแบบของโภชนเภสัชหรือส่วนประกอบของอาหาร กำลังเป็นที่นิยมและเป็นนวัตกรรมทางอาหาร แบคทีเรียแล็กติกมีความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์ของพืช ไซยาโนแบคทีเรีย หรือสาหร่ายขนาดเล็ก

ผ่านกระบวนการย่อย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน เช่น พอลิ-แซ็กคาไรด์ ไขมัน และโปรตีน ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง อีกทั้งยังช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และความสามารถในการปรับภูมิคุ้มกัน[15]

สาหร่ายขนาดเล็กและไซยาโนแบคทีเรียประกอบด้วยคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารตั้งต้นหรือซับสเตรต (substrate) ในกระบวนการหมัก โดยผลิตภัณฑ์หมักจากการใช้สาหร่ายทะเล สาหร่ายขนาดเล็กและสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์แตกต่างกัน ได้แก่ แบคทีเรียแล็กติก ยีสต์ หรือการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบผสม ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นที่ต้องการอย่างสูงในตลาดและขึ้นอยู่กับการใช้งานผลิตภัณฑ์ชีวภาพนั้น ๆ[20-22] การศึกษาก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกับการใช้สาหร่ายขนาดเล็กเป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแล็กติกหรือการเพาะลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก *Lactobacillus* ได้แก่ การใช้ชีวมวลสาหร่าย *Chlorella vulgaris* ESP-31 ที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแล็กติกโดยใช้จุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* 23[23] และ *L. brevis*[24] ขณะที่มีรายงานการใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแล็กติกโดยใช้จุลินทรีย์ *L. plantarum* ATCC 8014[22,25] และการใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าสดเป็นซับสเตรตในกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ *L. plantarum* ATCC 8014 เพื่อเพิ่มคุณสมบัติเชิงโภชนเภสัช[15] นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกหรือการผลิตกรดแล็กติกยังมีต้นทุนสูง โดยสารอาหารในการเพาะเลี้ยงที่มีราคาสูงเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตดังกล่าว และเป็นปัญหาข้อจำกัดของการผลิตกรดแล็กติกเชิงอุตสาหกรรม[26] แบคทีเรียแล็กติกต้องการสารอาหารเชิงซ้อน ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ ไนโตรเจน และวิตามิน โดยเฉพาะสารสกัดยีสต์และเปปโตนเป็นองค์ประกอบสำคัญที่กระตุ้นการเจริญ[26-27] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการประยุกต์ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่มีคุณค่าทางโภชนาการและอุดมไปด้วยสารอาหารเป็นซับสเตรตในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก เพื่อส่งเสริมและปรับปรุงคุณสมบัติทางชีวภาพของชีวผลิตภัณฑ์ และเป็นแนวทางในการเลือกใช้ซับสเตรตเพื่อลดต้นทุนของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมชีวมวลสาหร่าย

ทำการเตรียมชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่า *Spirulina platensis* IFRPD 1182 ในอ่างขนาดใหญ่กลางแจ้ง (raceway pond) ขนาด 500 ลิตร โดยมีการควบคุมการเพาะเลี้ยงแบบระบบเปิดด้วยความเร็วรอบของใบพัดเท่ากับ 15 รอบต่อนาที ทำการเติมกล้าเชื้อสาหร่ายสไปรูลิน่า *S. platensis* IFRPD 1182 ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว Zarrouk[28] ที่มีปริมาตรทำงาน 200 ลิตร เมื่อเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าเจริญเข้าสู่ระยะ exponential ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยการกรองและล้างด้วย

น้ำสะอาด นำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 8 เก็บชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นซับสเตรตในขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 ลงในอาหารเหลว De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกโดยใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรต

ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกโดยใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเติมกล้าเชื้อ *L. rhamnosus* ATCC 53103 ลงในสารแขวนลอยชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่า (*Spirulina* suspension) ทำการแปรผันความเข้มข้นของสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ระดับร้อยละ 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 (น้ำหนักโดยปริมาตรน้ำกลั่น) ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 150 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัด (pH meter) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติก (titratable acidity) ปริมาณไฟโคไซยานิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

4. การวิเคราะห์

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และทำการเก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัด (pH meter) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติก (titratable acidity) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต นำตัวอย่างมาเจือจางแล้วทำเทคนิคการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีเพื่อคำนวณหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่อตัวอย่าง

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติก โดยการไทเทรตด้วยสารละลายด่างมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติก

ปริมาณไฟโคไซยานิน โดยนำตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (SP-8001, UV-Vis Spectrophotometer, Metertech, Taiwan) ที่ความยาวคลื่น 615 และ 652 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาปริมาณไฟโคไซยานิน (C-phycocyanin, C-PC)[29]

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic contents, TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ทำการผสมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu (ความเข้มข้น 0.2 นอร์มอล) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำการบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (M965+, Microplate reader, Metertech, Taiwan) ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน แสดงผลในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมซับสเตรต (สาหร่ายสไปรูลิน่า)[30]

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging assay) ทำการผสมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (M965+, Microplate reader, Metertech, Taiwan) ใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน แสดงผลในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของวิตามินซีต่อกรัมซับสเตรต (สาหร่ายสไปรูลิน่า)[30]

ผลการทดลอง

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. rhamnosus* ATCC 53103 โดยใช้สาหร่ายสไปรูลิน่า *S. platensis* IFRPD 1182 เป็นซับสเตรตที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 0, 2.5, 5 และ 10 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อติดตามพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติกและปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ATCC 53103 ดังแสดงใน Figure 1-3 จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติก *L. rhamnosus* ATCC 53103 ลงในสาหร่ายสไปรูลิน่าที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของซับสเตรตเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีค่าความเป็นกรดด่างเพิ่มขึ้น เนื่องด้วยไม่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ดังนั้นค่าความเป็นกรดด่างจึงแปรผันตามปริมาณของสาหร่ายสไปรูลิน่าเริ่มต้น แต่อย่างไรก็ตามในระหว่างกระบวนการหมักไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างอย่างชัดเจน โดยการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่ไม่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่า (SP0) มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.06, 3.98 และ 3.95 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ ขณะที่การเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (SP2.5) มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.78, 4.78 และ 4.84 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมัก การเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติม

สาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 5 (SP5) มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.13, 5.20 และ 5.16 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมัก และการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 10 (SP10) มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.52, 5.60 และ 5.55 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมัก (Figure 1)

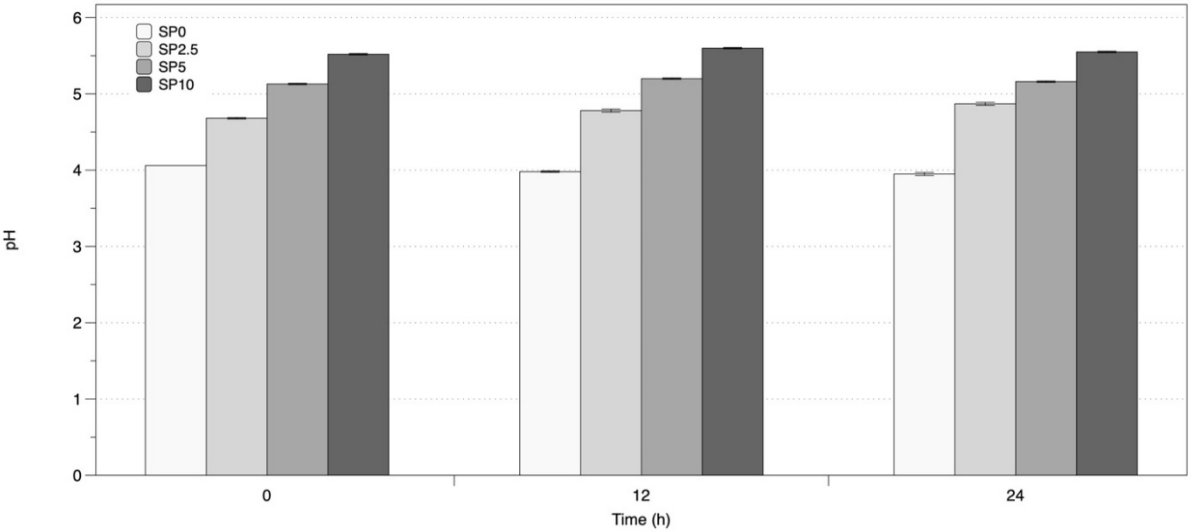

Figure 1 pH of *L. rhamnosus* ATCC 53103 cultivation at various *S. platensis* IFRPD 1182 concentration (SP0, SP2.5, SP5 and SP10 represent *Spirulina* concentration at 0 (control), 2.5, 5 and 10%, respectively). Data were calculated from triplicate experimental values ± standard deviation (SD).

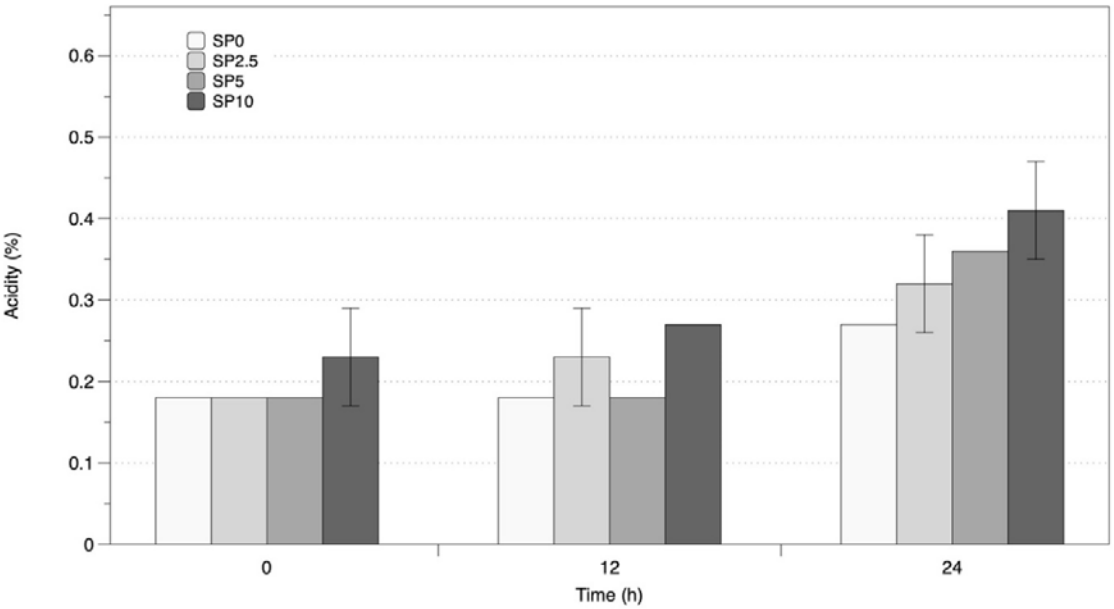

Figure 2 Titratable acidity of *L. rhamnosus* ATCC 53103 cultivation at various *S. platensis* IFRPD 1182 concentration (SP0, SP2.5, SP5 and SP10 represent *Spirulina* concentration at 0 (control), 2.5, 5 and 10%, respectively). Data were calculated from triplicate experimental values ± standard deviation (SD).

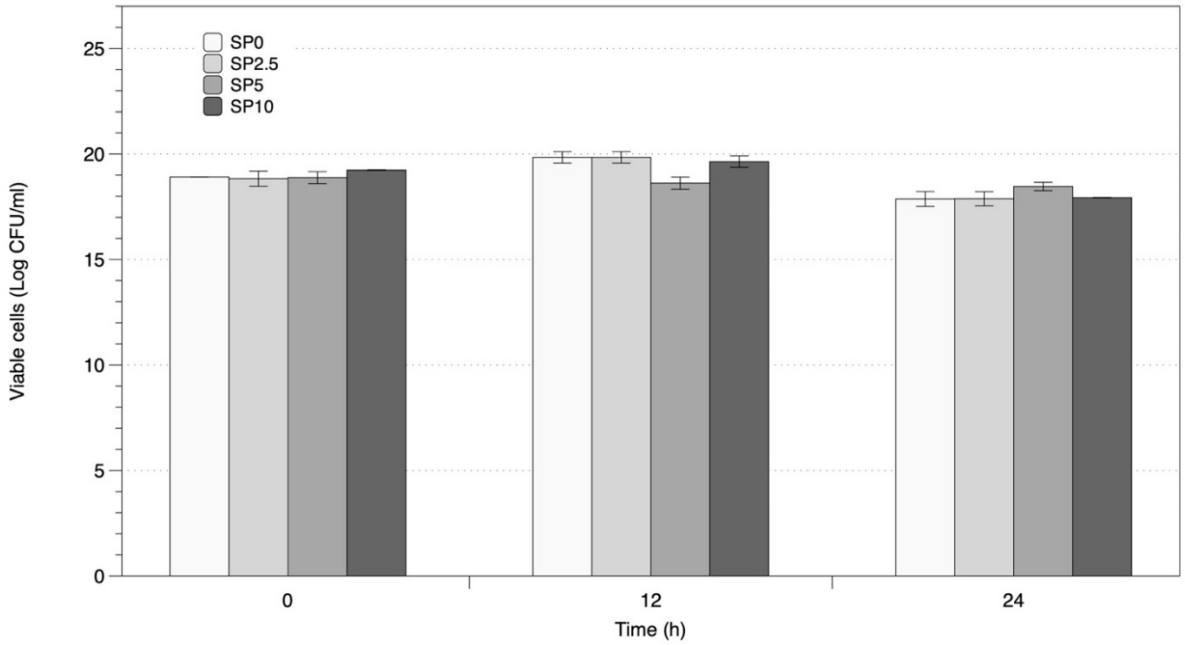

Figure 3 Viable cells of *L. rhamnosus* ATCC 53103 cultivation at various *S. platensis* IFRPD 1182 concentration (SP0, SP2.5, SP5 and SP10 represent *Spirulina* concentration at 0 (control), 2.5, 5 and 10%, respectively). Data were calculated from triplicate experimental values ± standard deviation (SD).

ผลของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแล็กติกพบว่า การเพิ่มปริมาณสาหร่ายสไปรูลิน่าส่งผลต่อปริมาณกรดแล็กติกตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น โดยสามารถเห็นได้ชัดเจนในระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก (Figure 2) โดยการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่ไม่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่า (SP0) มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับร้อยละ 0.18, 0.18 และ 0.27 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ ขณะที่การเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (SP2.5) มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับ 0.18, 0.23 และ 0.32 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ การเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 5 (SP5) มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับร้อยละ 0.18, 0.18 และ 0.36 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ และการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 10 (SP10) มีปริมาณกรดแล็กติกเท่ากับร้อยละ 0.23, 0.27 และ 0.41 ที่เวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมงของการหมักตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ATCC 53103 ในระหว่างกระบวนการหมัก (Figure 3) พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการหมักพบว่า ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ไม่ได้แสดงผล) เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ของการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ทั้ง

ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแล็กติก และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตพบว่า การใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและเป็นการเพิ่มสารอาหารในกระบวนการเพาะเลี้ยง ส่งผลให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณกรดที่เปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 มีสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตอย่างเดียว ไม่มีการเติมสารอาหารชนิดอื่น อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ATCC 53103 อย่างสมบูรณ์ จึงส่งผลต่อการผลิตกรดแล็กติกในกระบวนการหมัก

ผลของสารสำคัญและคุณสมบัติทางชีวภาพของสาหร่ายสไปรูลิน่าในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 แสดงดัง Table 1 ในการเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมสาหร่ายสไปรูลิน่านั้น ไม่พบปริมาณไฟโคไซยานิน (C-PC) สารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และฤทธิ์การต้านอนมูลอิสระ (DPPH) ขณะที่การเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 ที่มีการเติมสาหร่ายสไปรูลิน่าที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ส่งผลให้มีค่าปริมาณไฟโคไซยานิน สารฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณไฟโคไซยานินมีค่าสูงสุดเมื่อใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ใช้ระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการหมัก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 10 ภายใต้ระยะเวลาการหมักแตกต่างกัน ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าสูงสุดเมื่อเติมสาหร่ายสไปรูลิน่าความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ขณะที่คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงสุดเมื่อใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 10 ภายใต้ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของการเติมสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตที่ความเข้มข้นและระยะเวลาในการหมักแตกต่างกัน ไม่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ที่ชัดเจน

วิจารณ์

สาหร่ายสไปรูลิน่าที่เป็นแหล่งของโปรตีนที่อุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เท่ากับร้อยละ 47.65, 21.86 และ 19.87 ของชีวมวลแห้ง[31] จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า ในการประยุกต์ใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อเพิ่มมูลค่าเป็นชีวผลิตภัณฑ์ โดยการใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าสด (fresh *Spirulina*) ร่วมกับกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ *L. plantarum* ส่งผลต่อการเพิ่มคุณสมบัติทางโภชนเภสัช (nutraceutical)[15] นอกจากนี้ยังใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตในการผลิตก๊าซชีวภาพ[32] และกระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation) ของสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยแบคทีเรียแล็กติก เพื่อเพิ่มรูปแบบของสารระเหยที่เกิดขึ้น[33] โดยทั่วไปกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแล็กติกนิยมใช้น้ำตาลอย่างง่าย คือ น้ำตาลกลูโคสและซูโครส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน[34] การศึกษาก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่มุ่งเน้นการใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าโดยการย่อยคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายขนาดเล็กเป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นซับสเตรตในกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตาม

กระบวนการหมักในเชิงอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้คาร์โบไฮเดรตในปริมาณมากกว่าร้อยละ 70 ของชีวมวลสาหร่าย ซึ่งยังเป็นข้อจำกัดของการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตสาหร่ายสไปรูลิน่าที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงเป็นส่วนประกอบได้ในปริมาณมาก[35] จากองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสไปรูลิน่าแสดงให้เห็นว่า พบปริมาณโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่สารสกัดยีสต์ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกมีราคาสูง โดยที่สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งสารอาหารที่ประกอบด้วยวิตามินและกรดอะมิโนสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงประมาณร้อยละ 38 ของต้นทุนทั้งหมดในการผลิตกรดแล็กติก[36,37] ดังนั้นสาหร่ายสไปรูลิน่าจึงมีศักยภาพในการใช้เป็นซับสเตรตทดแทนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

แบคทีเรียแล็กติกสามารถสร้างกรดแล็กติกได้โดยผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนส (Phosphogluconase pathway) ซึ่งสามารถเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ร่วมต่าง ๆ ได้ เช่น แอซีเตต คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล โดยให้ผลผลิตกรดแล็กติกในปริมาณต่ำและเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมัก[38-39] โดยโมเลกุลไพรูเวตในวิถีสามารถถูกเปลี่ยนเป็นกรดแล็กติก แอซีเตต เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์[40] โมเลกุลเหล่านี้จะถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแล็กติกและชีวผลิตภัณฑ์ ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอซีเตตและเอทานอลที่ลดลงจะขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียในการรีออกซิไดซ์ NADH ที่สร้างขึ้นในขั้นตอนเริ่มต้นเช่นเดียวกับความต้องการพลังงาน[41] จากการศึกษานี้เพื่อให้สามารถดำเนินงานได้ง่ายและขยายขนาดได้ (scale-up) จึงไม่มีสารอาหารและแหล่งคาร์บอนเพิ่มเติม อีกทั้งสาหร่ายสไปรูลิน่า *Spirulina platensis* IFRPD 1182 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ATCC 53103 ไม่ผ่านการย่อยคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนกระบวนการหมัก ดังนั้นแบคทีเรียแล็กติกจึงไม่มีแหล่งคาร์บอนในการสร้างกรดแล็กติกตามวิถีดังกล่าว ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแล็กติกยังต้องอาศัยแหล่งอาหารและปัจจัยต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสาหร่ายสไปรูลิน่าในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง *L. rhamnosus* ATCC 53103 พบว่า ให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาก่อนหน้าในการประยุกต์ใช้สาหร่ายชีวมวลสไปรูลิน่าในรูปแบบสดเมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ *L. plantarum* ส่งผลต่อการเพิ่มคุณสมบัติทางโภชนเภสัช (nutraceutical)[15] การใช้ชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแล็กติกนั้น อาจไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแล็กติกอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สูตรอาหารเหลวสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามเป็นแนวทางในการพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสาหร่ายสไปรูลิน่าร่วมกับโพรไบโอติกได้ต่อไป

Table 1 C-phycocyanin (C-PC), total phenolic contents (TPC) and DPPH radical scavenging activity of *L. rhamnosus* ATCC 53103 cultivation at various *S. platensis* IFRPD 1182 concentration

S. platensis (%)	Time (h)	C-PC (mg/g)	TPC (ug GA/g)	DPPH (ug Vit C/g)
0 (control)	0	0^{c}	0^{e}	0^{g}
	12	0^{c}	0^{e}	0^{g}
	24	0^{c}	0^{e}	0^{g}
2.5	0	0.086 ± 0.03^{bc}	3669.49 ± 411.41^{a}	19.054 ± 2.62^{e}
	12	0.088 ± 0.00^{bc}	3681.62 ± 85.71^{a}	21.600 ± 1.70^{de}
	24	0.137 ± 0.04^{abc}	3431.11 ± 119.99^{a}	43.200 ± 3.39^{c}
5	0	0.208 ± 0.01^{ab}	2279.19 ± 34.28^{bc}	11.100 ± 0.42^{f}
	12	0.293 ± 0.22^{a}	2178.18 ± 68.57^{c}	22.400 ± 1.70^{d}
	24	0.183 ± 0.02^{abc}	2495.35 ± 48.57^{b}	46.800 ± 0.57^{b}
10	0	0.246 ± 0.13^{ab}	1441.62 ± 70.01^{d}	46.801 ± 0.57^{b}
	12	0.184 ± 0.01^{abc}	1450.71 ± 62.85^{d}	50.003 ± 0.57^{b}
	24	0.195 ± 0.02^{ab}	1493.13 ± 111.42^{d}	112.801 ± 5.01^{a}

Note : Data were calculated from triplicate experimental values ± standard deviation (SD). Data in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

บทสรุป

การศึกษาศักยภาพการใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ *L. rhamnosus* ATCC 53103 โดยใช้ความเข้มข้นของสาหร่ายสไปรูลิน่า *S. platensis* IFRPD 1182 แตกต่างกัน สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ในระยะสั้น แต่อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าร่วมกับแบคทีเรียแล็กติก โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกย่อมส่งผลเชิงบวกต่อสุขภาพ อีกทั้งยังเพิ่มคุณสมบัติทางชีวภาพเพื่อเกิดเป็นสารชีวผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าได้ นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นซับสเตรตร่วมกับแหล่งสารอาหารอื่น เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแล็กติกและเพิ่มผลผลิตกรดแล็กติกต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. de la Jara A, Ruano-Rodriguez C, Polifrone M, Assunçao P, Brito-Casillas Y, Wägner AM, Serra-Majem L. Impact of dietary *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass consumption on human health: main health targets and systematic review. Journal of Applied Phycology. 2018;30(4):2403-23.
2. Furmaniak MA, Misztak AE, Franczuk MD, Wilmotte A, Waleron M, Waleron KF. Edible Cyanobacterial Genus *Arthrospira*: Actual State of the Art in Cultivation Methods, Genetics, and Application in Medicine. Frontiers in Microbiology. 2017;8.
3. Ferreira A, Guerra I, Costa M, Silva J, Gouveia L. Chapter 15 - Future perspectives of microalgae in the food industry. In: Lafarga T, Acién G, editors. Cultured Microalgae for the Food Industry: Academic Press; 2021. p. 387-433.

4. Jha D, Jain V, Sharma B, Kant A, Garlapati VK. Microalgae-based Pharmaceuticals and Nutraceuticals: An Emerging Field with Immense Market Potential. ChemBioEng Reviews. 2017;4(4):257-72.
5. Mehariya S, Goswami RK, Karthikeysan OP, Verma P. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. Chemosphere. 2021;280:130553.
6. Khavari F, Saidijam M, Taheri M, Nouri F. Microalgae: therapeutic potentials and applications. Molecular biology reports. 2021;48(5):4757-65.
7. Yarkent Ç, Gürlek C, Oncel SS. Potential of microalgal compounds in trending natural cosmetics: A review. Sustainable Chemistry and Pharmacy. 2020;17:100304.
8. González-González LM, Correa DF, Ryan S, Jensen PD, Pratt S, Schenk PM. Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: Towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018;82:1137-48.
9. de Souza DS, Valadão RC, de Souza ERP, Barbosa MIMJ, de Mendonça HV. Enhanced Arthrospira platensis Biomass Production Combined with Anaerobic Cattle Wastewater Bioremediation. BioEnergy Research. 2022;15(1):412-25.
10. Mostafa SS, El-Gendy NS. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* bio-diesel and its blends with Egyptian petro-diesel. Arabian journal of chemistry. 2017;10:S2040-S50.
11. Raja R, Hemaiswarya S, Ganesan V, Carvalho IS. Recent developments in therapeutic applications of Cyanobacteria. Critical reviews in microbiology. 2016;42(3):394-405.
12. Chng LM, Chan DJC, Lee KT. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. Journal of Cleaner Production. 2016;130:68-73.
13. Christaki E, Florou-Paneri P, Bonos E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. International journal of food sciences and nutrition. 2011;62(8):794-9.
14. Nicoletti M. Microalgae nutraceuticals. Foods. 2016;5(3):54.
15. de Marco Castro E, Shannon E, Abu-Ghannam N. Effect of Fermentation on Enhancing the Nutraceutical Properties of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). Fermentation. 2019;5(1):28.
16. Thompson HO, Önning G, Holmgren K, Strandler H, Hultberg M. Fermentation of cauliflower and white beans with *Lactobacillus plantarum*–impact on levels of riboflavin, folate, vitamin B12, and amino acid composition. Plant Foods for Human Nutrition. 2020;75(2):236-42.
17. Eş I, Khaneghah AM, Barba FJ, Saraiva JA, Sant'Ana AS, Hashemi SMB. Recent advancements in lactic acid production-a review. Food Research International. 2018;107:763-70.
18. Raj T, Chandrasekhar K, Kumar AN, Kim S-H. Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. Systems Microbiology and Biomanufacturing. 2022;2(1):14-40.
19. Jiang X, Liu X, Xu H, Sun Y, Zhang Y, Wang Y. Improvement of the nutritional, antioxidant and bioavailability properties of corn gluten-wheat bran mixture fermented with lactic acid bacteria and acid protease. LWT. 2021;144:111161.
20. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. Trends in Food Science & Technology. 2011;22(6):315-26.
21. Uchida M, Miyoshi T. Algal fermentation—The seed for a new fermentation industry of foods and related products. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 2013;47(1):53-63.
22. Niccolai A, Shannon E, Abu-Ghannam N, Biondi N, Rodolfi L, Tredici MR. Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (*spirulina*) biomass for probiotic-based products. Journal of Applied Phycology. 2019;31(2):1077-83.
23. Chen PT, Hong ZS, Cheng CL, Ng IS, Lo YC, Nagarajan D, Chang JS. Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 2 3 using microalgae as feedstock. Bioresour Technol. 2020;308:123266.

24. Ścieszka S, Klewicka E. Influence of the Microalga *Chlorella vulgaris* on the Growth and Metabolic Activity of Lactobacillus spp. Bacteria. Foods (Basel, Switzerland). 2020;9(7):959.
25. Niccolai A, Bažec K, Rodolfi L, Biondi N, Zlatić E, Jamnik P, Tredici MR. Lactic Acid Fermentation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) in a Vegetal Soybean Drink for Developing New Functional Lactose-Free Beverages. Frontiers in Microbiology. 2020;11.
26. Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. Molecules. 2017;22(8):1255.
27. Abbasiliasi S, Tan JS, Tengku Ibrahim TA, Bashokouh F, Ramakrishnan NR, Mustafa S, Ariff AB. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. RSC Advances. 2017;7(47):29395-420.
28. Pan-utai W, Poopat N, Parakulsuksatid P. Photoautotrophic Cultivation of Arthrospira maxima for Protein Accumulation under Minimum Nutrient Availability. Applied Food Biotechnology. 2020;7(4):225-34.
29. Pan-utai W, Iamtham S, Boonbumrung S, Mookdasanit J. Improvement in the Sequential Extraction of Phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* Using Green Technologies. Life. 2022;12(11):1896.
30. Pan-utai W, Pantoa T, Roytrakul S, Praiboon J, Kosawatpat P, Tamtin M, Thongdang B. Ultrasonic-Assisted Extraction and Antioxidant Potential of Valuable Protein from *Ulva rigida* Macroalgae. Life. 2023;13(1):86.
31. Pan-utai W, Thitiprasert S, Pornpukdeewattana S. *Arthrospira* Cell Residues for Lactic Acid Fermentation as Bioproducts From Waste Utilization. Frontiers in Energy Research. 2022;10.
32. Dębowski M, Kisielewska M, Kazimierowicz J, Rudnicka A, Dudek M, Romanowska-Duda Z, Zielinski M. The effects of Microalgae Biomass Co-Substrate on Biogas Production from the Common Agricultural Biogas Plants Feedstock. Energies. 2020;13(9):2186.
33. Martelli F, Cirlini M, Lazzi C, Neviani E, Bernini V. Solid-State Fermentation of *Arthrospira platensis* to Implement New Food Products: Evaluation of Stabilization Treatments and Bacterial Growth on the Volatile Fraction. Foods. 2021;10(1):67.
34. Olszewska-Widdrat A, Alexandri M, López-Gómez JP, Schneider R, Venus J. Batch and Continuous Lactic Acid Fermentation Based on A Multi-Substrate Approach. Microorganisms. 2020;8(7):1084.
35. Liu Q, Yao C, Sun Y, Chen W, Tan H, Cao X, Xue S, Yin H. Production and structural characterization of a new type of polysaccharide from nitrogen-limited *Arthrospira platensis* cultivated in outdoor industrial-scale open raceway ponds. Biotechnology for Biofuels. 2019;12(1):131.
36. Meng Y, Xue Y, Yu B, Gao C, Ma Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic Bacillus sp. WL-S20. Bioresour Technol. 2012;116:334-9.
37. Ma K, Maeda T, You H, Shirai Y. Open fermentative production of l-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. Bioresource Technology. 2014;151:28-35.
38. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. AIMS Microbiol. 2018;4(4):665-84.
39. Abedi E, Hashemi SMB. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. Heliyon. 2020;6(10):e04974.
40. Mendes Ferreira A, Mendes-Faia A. The Role of Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Metabolism of Organic Acids during Winemaking. Foods. 2020;9(9).
41. Yu J, Ma D, Qu S, Liu Y, Xia H, Bian F, Zhang Y, Huang C, Wu R, Wu J, You S, Bi Y. Effects of different probiotic combinations on the components and bioactivity of *Spirulina*. J Basic Microbiol. 2020;60(6):543-57.