วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารจากสาหร่าย "เห็ดลาบ" (*Nostoc commune,* Cyanophyta)

อาภารัตน์ มหาขันธ์[1], อุษา กลิ่นหอม[2], มยุรี ตั้งธนานุวัฒน์[1], เจษฎา ทิพยะสุขศรี[2], วัชรี กัลยาลัง[1], วิวัธน์ ปฐมโยธิน[1], พรภัทรา ศรีนรคุตร[1], ปุณณภา บุญยะภักดี[1], เกศรา แซ่โค้ว[1], สุวรรณา ศรีสวัสดิ์[1], วัลลภา อรุณไพโรจน์[1] และ เสียงทอง นุตาลัย[1]

[1]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

Abstract: Research and Development on Food Products from "Hed Lab" Alga (*Nostoc commune,* Cyanophyta)

Aparat Mahakhant[1], Usa Klinhom[2], Mayuree Tungthananuwat[1], Chetsada Thippayasuksri[2], Watcharee Kunlayalung[1], Wiwat Phatomyothin[1], Pornpattra Srinorakutara[1], Poonnapha Bunyaphak[1], Kedsara Sae-khow[1], Suwanna Srisawas[1], Vullapa Arunpairojana[1] and Shiangthong Nutalai[1]

[1]Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Klong Luang, Pathumthani 12120, [2]Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai, Mahasarakham 44150

"Hed Lap" alga (HLA, *Nostoc commune* Voucher, Cyanophyta) is an edible blue-green alga (cyanobacterium). It was discovered on saline soil of a unique "Dun Lampan Forest" (DLF), Na Chuak district, Maha Sarakham province. In the rainy season, the only season for growth and propagation, the HLA are picked and cooked as a popular dish among the local people. Thus the HLA is a vulnerable species. The objective of this study is to determine basal data on the optimal cultivation medium and to develop various food products from HLA.

Analysis of the characteristics of 3 soils from land that the HLA can be found: the DLF, and the areas to the north and south of the DLF, indicated that all of them were sandy-loam soil. The pH, salinity and conductivity were 7.8-8.4, 0.3 g/l and 7.2 micro Siemen/cm, respectively. The concentrations of K, Ca, S and Na were similar. The concentrations of N and P were widely different within the range of 76-352 mg/kg and 185-809 mg/kg, respectively. Analysis of nutritional values of HLA, indicated that the natural HLA contained 20% protein, 0.02% fat and up to 43% of dietary fiber. In the case of cultivated HLA, vitamin A and the essential amino acids, methionine, leucine and tryptophan, were 9-, 5-, 2- and 3– fold higher than in the natural HLA. In contrast, the dietary fiber was only 1/17 that of the natural ones. From the analysis of microbial contamination of HLA and compared with the Thai standard for instant food (volume 210, B.E. 2543), it was found that microbes that can grow at 37^{O}C and the number of yeast and fungi of natural HLA exceeded that of the standard. In the case of the cultivated HLA, only the number of the microbes was above the standard. Analysis of heavy metal contamination in both natural and cultivated HLA indicated that the concentration of Hg, Pb and As in HLA did not exceed the standard of the Ministry of Health (volume 98, B.E. 2529). Acute oral toxicity tests of the HLA in rats according to OECD Guidelines for Testing of Chemicals 1993 showed no lethality and no adverse effect on all visceral organs. The bioactivies of HLA were also investigated. It was shown that the crude extract and cultivation broth of HLA showed good inhibition on the growth of a gram+ bacteria, *Bacillus subtilis* TISTR 008 but no inhibition was shown for the gram-bacteria, *Escherichia coli* TISTR 780 and *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781, and the filamentous fungi *Aspergillus niger* TISTR 3245. In addition, no anti-inflammatory effect was shown using the model of rats paw edema. The optimal cultivation medium of HLA was modified from agar BGA medium by not adding NaCl, increasing the concentrations of K_2HPO_4 and $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ to 0.9 and 0.095 mg/l, respectively, and using an initial pH of 7.5-8. The modified medium increased the final biomass by up to 34.05-fold that of the initial medium while only a 12.35-fold increase was obtained from the basal BGA medium. Various food products were developed as follows: the meal --- Thai dancing (furikake), lap (spicy salad), clear soup, tofu soup, salt & sour algal sheets; sweet --- agar (green tea and coconut flavors) and jelly (fruit flavors); snacks --- gold sheet (sweet and salty taste) and testy-crispy sheet; beverages --- fruit-flavored rice drink (pineapple, rossel and

lemon flavors). Long-term preservation of HLA can be done using cryopreservation techniques at -85°C using 3% dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant.

Key words: Hed Lap, *Nostoc*, blue-green algae, cyanobacteria, food product, *ex situ* conservation

---

บทนำ

ด้วยคำขวัญประจำถิ่นของ “ป่าดูนลำพัน” ที่ว่า

ถิ่นปูแสนสวย	กล้วยไม้แสนงาม	บ่อน้ำลือไกล
สมุนไพรมากมี	พื้นที่ชุ่มน้ำ	งามพร้อมพืชพรรณ
สีสันนกเหยี่ยว	เจี๊ยวจ๊าวนกกลิ้งโครง	พฤกษ์พง **“เห็ดลาบ”**

เป็นเครื่องยืนยันอย่างดี ถึงความสมบูรณ์ของความหลากหลายทางชีวภาพของป่าดูนลำพัน ประกอบเข้ากับสภาพพื้นที่เป็นระบบนิเวศที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่อาศัยถิ่นเดียวของ “ปูทูลกระหม่อม” (*Thaipotamon chulabhorn* Naiynetr) ซึ่งสามารถแพร่พันธุ์ และดำรงชีวิตอยู่ได้เฉพาะในพื้นที่นี้เท่านั้น ด้วยเหตุนี้ “ป่าดูนลำพัน” ในเขตอำเภอนาเชือก จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งมีพื้นที่เล็กๆ เพียง 300 ไร่ จึงได้รับการประกาศเป็นเขตห้ามล่าสัตว์ป่าและพื้นที่คุ้มครองทรัพยากรธรรมชาติ ตาม พ.ร.บ. สิ่งแวดล้อมแห่งชาติ 2535 เมื่อวันที่ 20 มกราคม 2541

นอกจาก “ปูทูลกระหม่อม” ซึ่งเป็นปูที่สวยงามมากชนิดใหม่ของโลกที่สร้างชื่อเสียงให้กับท้องถิ่นและประเทศไทยแล้ว ยังมีของดีในป่าดูนลำพันอีกอย่าง ที่น้อยคนจะได้รับทราบนั่นก็ คือ “เห็ดลาบ” ที่ในความเป็นจริง คือ สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว (blue-green alga, cyanobacterium) ที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน (N_2-fixation) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nostoc commune* Vaucher แต่เนื่องจากสาหร่ายนี้มีลักษณะเป็นแผ่นวุ้นแบนบางคล้ายเห็ดหูหนูสีเขียวที่ขึ้นบนดิน และชาวบ้านนิยมเก็บไปทำลาบ จึงได้ชื่อประจำท้องถิ่นว่า “เห็ดลาบ” อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เกิดความเข้าใจที่ถูกต้องรายงานฉบับนี้จึงใช้ชื่อ “สาหร่ายเห็ดลาบ” เพื่อสร้างความเข้าใจที่ถูกต้องต่อไป

สาหร่ายน้ำจืดในสกุล *Nostoc* เป็นอาหารท้องถิ่นที่นิยมรับประทานในหลายประเทศทั่วโลก นอกจากจะมีการรายงานในต่างประเทศแล้ว รศ. อักษร ศรีเปล่ง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2525) เคยเขียนถึงสาหร่ายที่รับประทานได้ในสกุลนี้ในชื่อ “ไข่หิน” หรือ “ดอกหิน” ในปัจจุบันได้สูญหายไปจากท้องถิ่นจนไม่เป็นที่รู้จัก ซึ่งต่างจากสาหร่ายเทา หรือเตาน้ำ (*Spirogyra* spp.) และสาหร่ายไก (*Cladophora* spp.) ที่ยังเป็นที่นิยมบริโภคในหลายพื้นที่ในแถบจังหวัดภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ

ถึงแม้นว่าสาหร่ายเห็ดลาบจะเจริญเติบโตบนดินเค็มในพื้นที่คุ้มครองทรัพยากรธรรมชาติป่าดูนลำพัน แต่เนื่องจากในฤดูฝน เมื่อเกิดฝนตกจะทำให้สาหร่ายที่ในหน้าร้อนจะหดตัวเป็นแผ่นบางกรอบ คล้ายกระดาษ (ซึ่งเป็นระยะพักตัว, resting stage) ดูดซับน้ำฝนขยายตัวเป็นแผ่นวุ้นบางไม่มีรสชาด มีเนื้อนิ่มหยุ่นแต่กรอบ คล้ายสาหร่ายทะเล สกุล *Undaria pinnatifida* ที่นิยมบริโภคในญี่ปุ่น อย่างไรก็ตามสาหร่ายเห็ดลาบมีคุณสมบัติที่ดีกว่า คือ ไม่มีกลิ่นคาว ทำให้ชาวบ้านนิยมเก็บไปบริโภคเป็นประจำทุกปีในฤดูฝนซึ่งเป็นเพียงฤดูกาลเดียวเท่านั้นที่สาหร่ายชนิดนี้จะแพร่และขยายพันธุ์ได้ จนเป็นที่น่าเกรงว่าความนิยมบริโภค “เห็ดลาบ” ของชาวบ้านในท้องถิ่นจะเป็นสาเหตุให้สาหร่ายเห็ดลาบสูญหายไปจากพื้นที่ในที่สุด

จากการที่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษาวิจัยถึงความสัมพันธ์ระหว่างนิเวศวิทยาของป่าดูนลำพันกับการเกิดขึ้นของสาหร่าย ประกอบกับการเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของสาหร่ายเห็ดลาบ ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงและผลิตผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายเห็ดลาบจึงเป็นแนวทางที่สำคัญเร่งด่วนในการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อการอนุรักษ์สาหร่ายเห็ดลาบให้คงอยู่คู่กับท้องถิ่นตลอดไป พร้อมทั้งมีการพัฒนาการใช้ประโยชน์ให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจระดับชุมชน/ระดับประเทศอย่างยั่งยืน

นอสตอค (*Nostoc commune* ; “ไข่หิน”, “ดอกหิน”, “เห็ดลาบ” (ไทย), “Koxianmi” (จีน) “Ishikurage” (ญี่ปุ่น); *N. flagelliforme*; “Fat tsai”, “Facai”, “Shi” (จีน) ; *Nostoc* spp., “Star shot”, “Star jelly”, “Witches’ butter”, “Fairies’ butter” (ยุโรป) เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีการเจริญเติบโตแบบเป็นเส้นสายมีเมือกห่อหุ้ม บางชนิดดูคล้ายก้อนเยลลี่ ชนิดที่นิยมบริโภคมาก คือ *Nostoc commune* มีการบริโภคในหลายประเทศทั่วโลก เช่น โบลิเวีย, เอควาดอร์, ฟิจิ, อินโดนีเซีย, ญี่ปุ่น, เมกซิโก, มองโกเลีย และจีน โดยชาวจีนนิยมนำมาทำเป็นขนมหวาน ส่วน *N. flagelliforme* เป็นอาหารที่มีราคาแพงซึ่งชาวจีนนิยมบริโภคเพื่อความเป็นสิริมงคลในวันขึ้นปีใหม่ สำหรับประเทศไทยในอดีตเคยมีการบริโภคนอสตอคโดยรู้จักกันในชื่อ “ไข่หิน” หรือ “ดอกหิน” แล้ว ยังมีสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นเยลลี่คล้ายนอสตอค แต่เมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเป็นเส้นสายที่มีการแตกแขนง ชาวบ้านในจังหวัดน่านนิยมนำมาบริโภคเพื่อแก้อาการร้อนใน โดยเรียกสาหร่ายชนิดนี้ว่า “ลอน” (*Nostochopsis* sp.)

ส่วน “เห็ดลาบ” เป็นสาหร่าย *N. commune* ที่บริโภคได้ของประเทศที่เพิ่งมีการเปิดตัวโดยพบในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพันซึ่งเป็นป่าที่มีระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะตัวของอำเภอนาเชือก จังหวัดมหาสารคาม โดยการสำรวจของ ดร. อุษา กลิ่นหอม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พบว่าประชาชนในพื้นที่เก็บเห็ดลาบซึ่งเจริญเติบโตได้รวดเร็วในช่วงฤดูฝนมาบริโภค ส่วนชื่อ “เห็ดลาบ” นั้น ได้มาจากลักษณะของสาหร่ายที่เป็นแผ่นวุ้นสีเขียวคล้ายเห็ดหูหนู และการที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคโดยการทำเป็นลาบ

ความนิยมบริโภคสาหร่ายน้ำจืด สกุล *Nostoc* เปรียบเทียบกับสกุลอื่นๆ ในประเทศต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

การวิจัยในต่างประเทศค้นพบมาเป็นเวลานานแล้วว่า สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่ตรึงไนโตรเจนได้มีบทบาทอย่างสูงในการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ชุ่มน้ำและนาข้าว (Sinha and Häder, 1996) โดยพบว่าสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้ดีในพื้นที่แห้งแล้ง หรือกึ่งแห้งแล้ง จะเป็นสาหร่ายที่สามารถสร้างเมือกหนา หรือมีแคปซูลเจล (capsular jelly) ห่อหุ้ม เช่น สาหร่ายสกุล *Nostoc* ซึ่งเมือกนี้จะมีความสำคัญในการก่อให้เกิดโครงสร้างของอนุภาคดินที่ดี รวมทั้งช่วยในการรักษาความชื้นไว้ในดินได้เป็นเวลานาน (Flaibani et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าสาหร่ายชนิดที่สายเซลล์ฝังตัวในแผ่นเมือกที่ห่อหุ้ม เช่น *Nostoc commune* จะมีความทนทานต่อรังสีอุลตร้าไวโอเลตสูงกว่าสกุล/ชนิดอื่นที่ไม่มีเมือกห่อหุ้ม เช่น *Anabaena* sp. (Sinha et al., 1995)

ตารางที่ 1. สาหร่ายน้ำจืดจากแหล่งธรรมชาติที่มีการบริโภคเป็นอาหารในประเทศต่างๆ

Country	Algae
Bolivia	***Nostoc commune***
Burma	*Spirogyra* spp.
Chad	*Arthrospira platensis*
China	***Nostoc commune* var. flagelliforme**
	Nostoc edule, *Prasiola yunnanica*
Ecuador	***Nostoc commune, N. ellipsosporum***
Fiji	***Nostoc* spp.**
“Himalayas”	*Prasiola spp.*
India	*Lemanea mamillosa, Oedogonium* spp., *Spirogyra* spp.
“Indochina”	*Spirogyra* spp.
Indonesia (Java)	***Nostoc commune***
Japan	*Aphanothece sacrum,* ***Nostoc commune, N.***
	verrucosum*, Prasiola japonica*
Mexico	*Chroococcus turgidus,* ***Nostoc commune****,*
	Phormidium tenue, Spirulina spp.
Mongolia	***Nostoc commune, N. edule***
Okinawa	***Nostoc* sp.**
Peru	***Nostoc pruniforme***
Thailand	***Nostoc verrucosum,*** *Spirogyra* spp., *Cladophora* spp.,
	Nostochopsis sp.
US (Hawaii)	*Enteromorpha* spp.
USSR (Siberia)	***Nostoc edule***

ที่มา : Lembi and Waaland (1988)

สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวบางชนิดสามารถคงความมีชีวิตได้เป็นเวลานานหลายปี และสามารถกลับมาเจริญเติบโตและสร้างกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ภายหลังการคืนสภาพ โดยการดูดน้ำกลับเข้าไปในเซลล์ (rehydration) (Dodds et al., 1995) และยังมีรายงานว่า *N. commune* ที่แกะจากเฮอร์บาเรียม (herbarium) อายุ 107 ปี ยังคงความมีชีวิตอยู่รอดได้ (Lund and Lund, 1995) ทั้งนี้สันนิษฐานว่าคุณสมบัติดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับสารพอลิแซ็กคาไรด์หรือสารไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugates) ที่ผลิตโดยสาหร่าย เช่นเดียวกับในกรณีของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Huang et al., 1998)

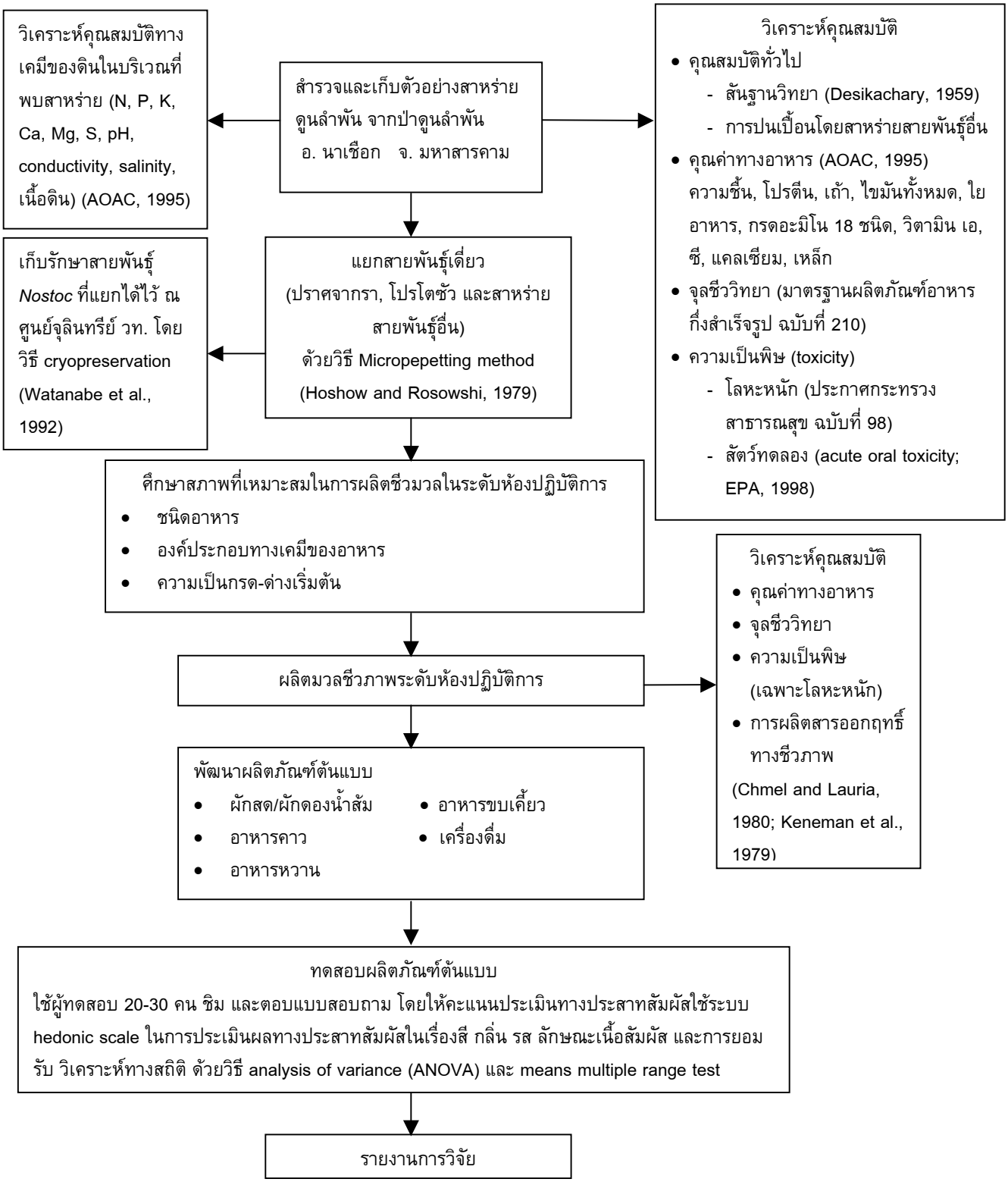
Nostoc เป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่มีลักษณะเส้นสายคล้าย *Anabaena* แต่มีเส้นสายที่พันกันยุ่งเหยิง และฝังตัวอยู่ในเมือกหุ้ม ซึ่งเมือกที่ห่อหุ้มอาจมีลักษณะนุ่มหรือแน่น ทำให้มีลักษณะผิวคล้ายแผ่นหนังสามารถสร้างกลุ่มเซลล์ได้ทั้งขนาดเล็กและใหญ่ สาหร่ายในสกุล *Nostoc* สามารถแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในที่แห้งแล้ง เช่น ทะเลทรายโกเบ หรือที่หนาวเย็น เช่น สถานที่ที่เรียกว่า “Polar Deserts” ในขั้วโลกใต้ นอกจากนี้ยังเคยมีผู้สำรวจพบก้อนวุ้นของ *Nostoc* ขนาดใหญ่ น้ำหนักถึง 2.6 กิโลกรัม ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Lund and Lund, 1995) Lazaroff (1973) และ Abdelahad และ Bazzichelli (1989) ได้ทำการศึกษาวงจรชีวิต การสร้างกลุ่มเซลล์ ตลอดจนลักษณะสัณฐานวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปสัณฐานในวงจรชีวิตของ *Nostoc* (polymorphic life cycle)

ในส่วนของการใช้ประโยชน์จาก *Nostoc* มีรายงานโดยสมาชิกของคณะนักสำรวจขั้วโลกใต้ของเครือจักรภพอังกฤษ (Comonwealth Transantarctic Expedition) ระหว่างปี 1955-1958 พบว่ามี *Nostoc* แพร่กระจายอย่างกว้างขวางตั้งแต่เหนือเส้นรุ้งที่ 60° ใต้ ขึ้นมา รวมทั้งมีการทดลองบริโภคเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหาร (Lund and Lund, 1995) Chu และ Tsang (1988) รายงานว่ามีการใช้ *Nostoc* เป็นอาหารในประเทศจีนมาเป็นเวลานานมาก *Nostoc* บางชนิดยังใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งและเก๊าต์ ในขณะที่ Hoppe (1979), Bloor และ England (1989), de Caire และคณะ (1987, 1990) รายงานการค้นพบสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อย่างกว้างขวางทั้งจากสารสกัดเซลล์และอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ มีรายงานว่า *N. commune* สามารถลดโคเลสเตอรอลในซีรั่มได้อย่างมีนัยสำคัญในหนูทดลอง โดยคาดว่าความสามารถในการลดโคเลสเตอรอลนี้น่าจะมาจาก “ใยอาหาร” (dietary fiber) (Hori et al., 1994) ในตำรับแพทย์แผนจีนมีการนำ *N. commune* และ *N. spiroides* มาใช้ในการบำบัดโรคตาบอดในเวลากลางคืน (night blindness), แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ตลอดจนอาการเจ็บป่วยที่ไม่รุนแรงต่างๆ มีการวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของ *N. flagelliforme* มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (antitumor) ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์ (Takenaka et al., 1997) Huang และคณะ (1998) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Nostoc* 3 ชนิด ที่รับประทานได้ ได้แก่ *N. commune, N. flagelliforme, N. sphaeroides* ที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ และที่ได้จากการเพาะเลี้ยง พบว่าองค์ประกอบหลักของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากตัวอย่างกลุ่มเซลล์ของ *Nostoc* ทั้ง 3 ชนิด ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ กลูโคส ไซโรส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 2 : 1 : 1 โดยประมาณ ทั้งยังพบว่ามีแมนโนสในระดับต่ำและมีความแปรปรวนระหว่างชนิด และพบว่าเฉพาะใน *N. flagelliforme* เท่านั้นที่มีอาราบิโนส ส่วนองค์ประกอบของสารพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงสาหร่ายและจากเซลล์สาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงพบว่ามีความซับซ้อนมากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติ และมีความแปรปรวนระหว่างชนิด

ในปัจจุบันในประเทศญี่ปุ่น มีผลิตภัณฑ์เซลล์แห้งของ *N. flagelliforme* ซึ่งมีสรรพคุณในการลดโคเลสเตอรอลและยับยั้งการเกิดเนื้องอกในลำไส้ โดยบริษัท Micro-algae Corporation ออกวางจำหน่ายตั้งแต่ปี 1999

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาคุณสมบัติ เทคนิคการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเห็ดลาบ พร้อมทั้งศึกษาการอนุรักษ์สายพันธุ์นอกถิ่นกำเนิดเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

วิธีการ


วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของดินในบริเวณที่พบสาหร่าย (N, P, K, Ca, Mg, S, pH, conductivity, salinity, เนื้อดิน) (AOAC, 1995)
สำรวจและเก็บตัวอย่างสาหร่าย ดูนลำพัน จากป่าดูนลำพัน อ. นาเชือก จ. มหาสารคาม
วิเคราะห์คุณสมบัติ
• คุณสมบัติทั่วไป
- สันฐานวิทยา (Desikachary, 1959)
- การปนเปื้อนโดยสาหร่ายสายพันธุ์อื่น
• คุณค่าทางอาหาร (AOAC, 1995) ความชื้น, โปรตีน, เถ้า, ไขมันทั้งหมด, ใยอาหาร, กรดอะมิโน 18 ชนิด, วิตามิน เอ, ซี, แคลเซียม, เหล็ก
• จุลชีววิทยา (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูป ฉบับที่ 210)
• ความเป็นพิษ (toxicity)
- โลหะหนัก (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98)
- สัตว์ทดลอง (acute oral toxicity; EPA, 1998)
เก็บรักษาสายพันธุ์ *Nostoc* ที่แยกได้ไว้ ณ ศูนย์จุลินทรีย์ วท. โดยวิธี cryopreservation (Watanabe et al., 1992)
แยกสายพันธุ์เดี่ยว (ปราศจากรา, โปรโตซัว และสาหร่ายสายพันธุ์อื่น) ด้วยวิธี Micropepetting method (Hoshow and Rosowshi, 1979)
ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตชีวมวลในระดับห้องปฏิบัติการ
• ชนิดอาหาร
• องค์ประกอบทางเคมีของอาหาร
• ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น
วิเคราะห์คุณสมบัติ
• คุณค่าทางอาหาร
• จุลชีววิทยา
• ความเป็นพิษ (เฉพาะโลหะหนัก)
• การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
(Chmel and Lauria, 1980; Keneman et al., 1979)
ผลิตมวลชีวภาพระดับห้องปฏิบัติการ
พัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ
• ผักสด/ผักดองน้ำส้ม
• อาหารคาว
• อาหารหวาน
• อาหารขบเคี้ยว
• เครื่องดื่ม
ทดสอบผลิตภัณฑ์ต้นแบบ
ใช้ผู้ทดสอบ 20-30 คน ชิม และตอบแบบสอบถาม โดยให้คะแนนประเมินทางประสาทสัมผัสใช้ระบบ hedonic scale ในการประเมินผลทางประสาทสัมผัสในเรื่องสี กลิ่น รส ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับ วิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยวิธี analysis of variance (ANOVA) และ means multiple range test
รายงานการวิจัย

ผลการวิจัย

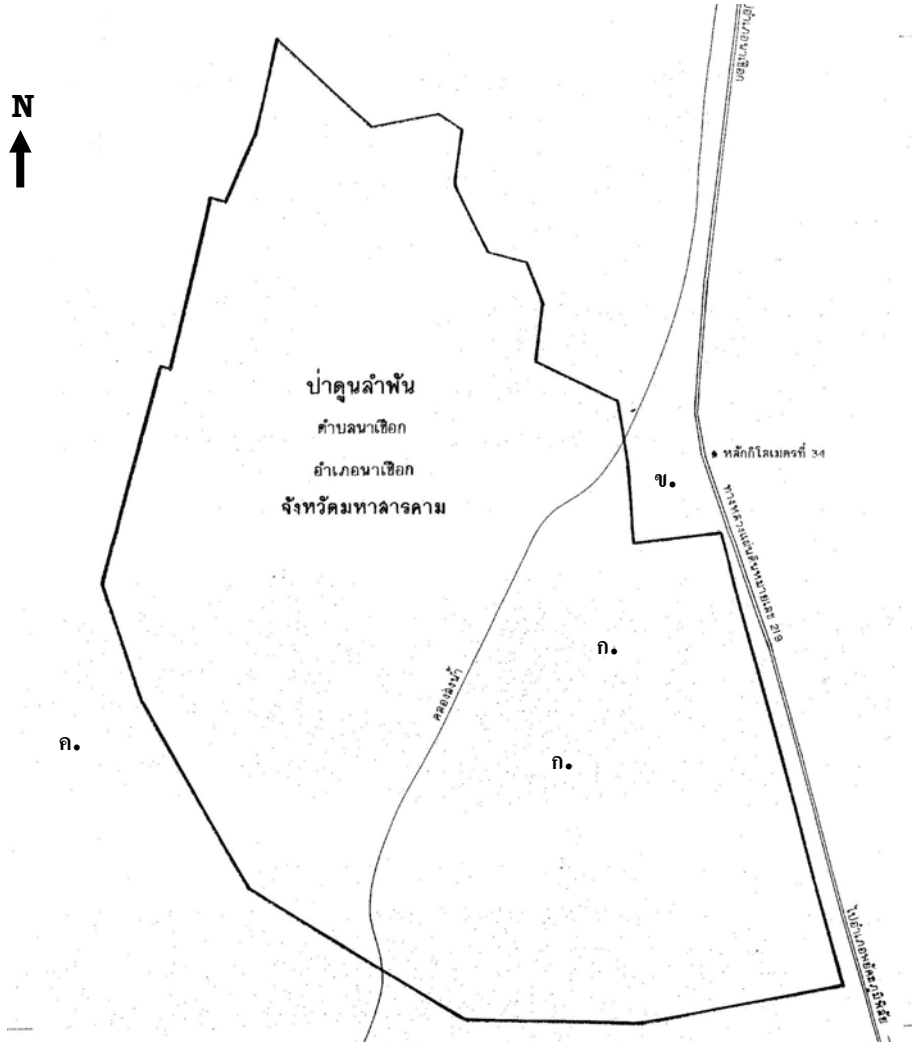
1. การสำรวจสาหร่ายเห็ดลาบบริเวณป่าดูนลำพันและพื้นที่ข้างเคียง

บริเวณที่สำรวจพบสาหร่ายเห็ดลาบ แสดงในภาพที่ 1

ในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพันสามารถพบสาหร่ายเห็ดลาบได้บริเวณพื้นที่เสื่อมโทรมของบริเวณเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพันติดกับที่ทำการ ลักษณะดินเป็นดินทราย พบพรรณไม้ที่ขึ้น คือ หญ้าหางหมาจอก หญ้าแฝกไหม และหญ้าหัวบ่อ ใต้ต้นรวงไซ

บริเวณทิศเหนือติดกับเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน เป็นที่เสื่อมโทรม ดินเป็นดินทรายผสมกับดินลูกรัง พบส่าเกลือขึ้นใกล้เคียงกับบริเวณที่เก็บตัวอย่าง พืชที่ขึ้นเป็นพืชตระกูลหญ้า

บริเวณทางด้านทิศใต้ของเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน เป็นที่ของเกษตรกร พบสาหร่ายเห็ดลาบขึ้นในบริเวณที่ไม่ได้มีการทำนา ดินลักษณะเป็นดินร่วนปนทราย



ภาพที่ 1. บริเวณที่สำรวจพบสาหร่ายเห็ดลาบ
- ก. ในพื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน
- ข. พื้นที่ด้านทิศเหนือของป่าดูนลำพัน
- ค. พื้นที่ด้านทิศใต้ของป่าดูนลำพัน

ตารางที่ 2. คุณสมบัติทางกายภาพของดินที่สำรวจพบว่ามีสาหร่ายเห็ดลาบเจริญเติบโต

จุดที่เก็บ	เนื้อดิน	อินทรียวัตถุ	pH	ความเค็ม (กรัมต่อลิตร)	ค่าการนำไฟฟ้า (ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)	ธาตุอาหารที่พบในดิน (มก./กก.)										
						N	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cl	Zn	Fe	Mn	Cu
1. ดินในเขตห้ามล่าฯ	ร่วนปนทราย	0.4	7.89	0.3	7.26	76	809	13	0.07	22	36	91	32	ND	1.624	ND	ND
2. ดินด้านทิศเหนือ	ร่วนปนทราย	0.6	7.81	0.3	7.27	352	322	13	0.09	88	36	86	326	0.37	2.214	10	0.008
3. ดินด้านทิศใต้	ร่วนปนทราย	0.8	8.36	0.3	7.28	291	185	14	0.79	165	36	71	84	0.63	744	17	0.005

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน

ผลวิเคราะห์คุณสมบัติของดิน บริเวณที่สำรวจพบสาหร่ายเห็ดลาบ แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งแสดงผลวิเคราะห์คุณสมบัติของดินทางกายภาพและเคมีในแง่ของปริมาณธาตุอาหาร พบว่า ดินที่สำรวจพบสาหร่ายเห็ดลาบทั้ง 3 แห่ง มีคุณสมบัติเป็นดินร่วนปนทราย มีอินทรีย์วัตถุอยู่ระหว่าง 0.4-0.8% pH ระหว่าง 7.81-8.36 ความเค็มและค่าการนำไฟฟ้าที่เท่ากัน คือ 0.3 กรัมต่อลิตร และ 7.2 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของธาตุอาหารในดิน พบว่า โปแตสเซียม แคลเซียม ซัลเฟอร์ โซเดียม ในทั้ง 3 แห่ง มีค่าใกล้เคียงกันมาก ส่วนธาตุสังกะสี มังกานีส และทองแดง ตรวจไม่พบในตัวอย่างดินจากเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพัน สำหรับธาตุอาหารหลักของสาหร่าย คือ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส พบว่า ทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณแตกต่างกันในช่วงกว้าง โดยไนโตรเจนพบในช่วง 76-352 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่ฟอสฟอรัสพบในช่วง 185-809 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างดินในเขตห้ามล่าสัตว์ป่าดูนลำพันจะมีปริมาณไนโตรเจนต่ำที่สุด ในขณะที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงที่สุดเช่นกัน ส่วนธาตุอาหารรอง พบว่าปริมาณแมกนีเซียมมีความแตกต่างในช่วงกว้างระหว่าง 22-165 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ข้อมูลธาตุอาหารบ่งชี้ว่า สาหร่ายเห็ดลาบสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความแตกต่างของธาตุอาหารที่สำคัญในช่วงกว้างได้

3. การวิเคราะห์คุณสมบัติสาหร่ายเห็ดลาบ

สาหร่ายเห็ดลาบสด (ภาพที่ 2) มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง หนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร มีสีตั้งแต่สีน้ำเงินแกมเขียวจนถึงสีเหลือง ขนาดของแผ่นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับสถานที่ที่พบ หากเป็นพื้นที่ที่มีน้ำขังแฉะอยู่นานสาหร่ายที่พบจะมีลักษณะเป็นแผ่นขนาดใหญ่ ส่วนสาหร่ายเห็ดลาบแห้งจะมีลักษณะหดตัวเป็นแผ่นแข็ง สีน้ำตาลถึงดำ มีลักษณะขรุขระ (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 2. สาหร่ายเห็ดลาบสด

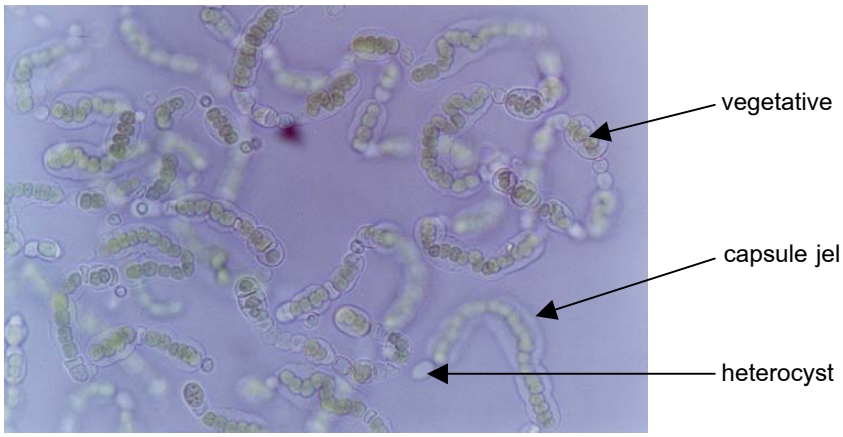
การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของสาหร่ายเห็ดลาบใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4) และจัดอนุกรมวิธานตามคู่มือของ Desikachary (1959) พบว่าเป็นสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ ชนิด *Nostoc commune* voucher มีลักษณะของทัลลัส (thallus) ประกอบด้วยเซลล์ที่มีแคปซูลเจลใส (hyaline capsular jelly) ห่อหุ้มรวมตัวกันอย่างหนาแน่น (firm) และพันกันยุ่งเหยิง (entangled) ทรัยโคมมีความกว้าง

5-7 ไมครอน เซลล์รูปถัง (barrel-shaped) ถึงค่อนข้างกลม ขนาดกว้าง 6.69 ไมครอน ยาว 8.05 ไมครอน เฮทเทอโรซีสต์ (heterocyst) รูปร่างค่อนข้างกลม กว้างประมาณ 7.25 ไมครอน

การตรวจสอบการปนเปื้อนของแผ่นสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ พบว่ามีการปนเปื้อนบนผิวของแผ่นสาหร่ายเห็ดลาบจากสาหร่ายอื่นๆ คือ กลุ่มสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว ได้แก่ *Phormidium* sp., *Oscillatoria* sp. และ *Scytonema* sp. และกลุ่มไดอะตอม ได้แก่ *Navicula* sp., *Achnanthes* sp. และ *Fragilaria* sp. โดยพบการปนเปื้อนต่ำกว่า 10% ของพื้นที่ของแผ่นสาหร่ายเห็ดลาบ และสามารถลดการปนเปื้อนจากสาหร่ายได้ง่าย โดยการล้างด้วยน้ำและใช้มือถู

ภาพที่ 3. สาหร่ายเห็ดลาบแห้ง

การศึกษาปริมาณน้ำในแผ่นสาหร่ายเห็ดลาบสดจากแหล่งธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยง โดยการอบแห้ง (55 องศาเซลเซียส), ผึ่งแดด และระเหิดแห้ง (freeze-dried) พบว่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายเห็ดลาบคิดเป็น 4.45±0.03, 4.94±0.12 และ 4.10±0.02% ของน้ำหนักสดตามลำดับ หรือสาหร่ายเห็ดลาบสดจากแหล่งธรรมชาติจะมีความชื้นประมาณ 95-96% ในขณะที่น้ำหนักแห้งของสาหร่ายที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะมีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 2.65±0.03, 2.34±0.11 และ 2.03±0.02% ตามลำดับ หรือสาหร่ายเห็ดลาบสดจากการเพาะเลี้ยงจะมีความชื้นประมาณ 97-98% เมื่อนำสาหร่ายเห็ดลาบแห้งจากทั้ง 2 แหล่งไปคืนสภาพโดยการแช่ในน้ำกลั่น พบว่าสาหร่ายเห็ดลาบสามารถคืนสภาพ และคงลักษณะไว้ได้เช่นเดิม



ภาพที่ 4. สัณฐานวิทยาของสาหร่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง

ผลวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ แสดงในตารางที่ 3 สาหร่ายเห็ดลาบมีโปรตีน 20% โดยมีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบถ้วน ในขณะที่มีไขมันต่ำเพียง 0.02% และที่น่าสนใจ คือ มีใยอาหารสูงถึง 43% ส่วนสาหร่ายเห็ดลาบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม (BGA ดัดแปลง) พบว่ามีวิตามินเอเพิ่มเป็น 9 เท่า มีกรดอะมิโนจำเป็น เมไทโอนีน ลูซีน และทริปโตเฟน เพิ่มเป็นประมาณ 5, 2 และ 3 เท่าตามลำดับ ในขณะที่มีใยอาหารเหลือเพียง 1 ใน 17 ส่วนของตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติจะมีการเจริญเติบโตในลักษณะเป็นแผ่นวุ้นที่สร้างแคปซูลเจลหนาแน่นล้อมรอบเส้นสาย ในขณะที่ตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดเล็กที่มีการหลั่งสารพอลิแซ็กคาไรด์ (ซึ่งเป็นใยอาหารรูปแบบหนึ่ง) ออกสู่ภายนอก เมื่อเก็บเกี่ยวเฉพาะเซลล์จึงมีปริมาณใยอาหารน้อยกว่าจากแหล่งธรรมชาติ

เมื่อพิจารณาคุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเห็ดลาบเปรียบเทียบกับสกุล *Nostoc* ทั้งชนิด *N. commune* และ *N. flagelliforme* ที่มีการศึกษาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ปักกิ่ง เจียงสู และนิงเซีย (Gao, 1998; Chu and Tsang, 1988) ในประเทศจีนแล้ว พบว่า มีปริมาณโปรตีนที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 20% อย่างไรก็ตามสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทยมีปริมาณใยอาหารสูงกว่า 10-20 เท่า

ตารางที่ 3. คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายเห็ดลาบและสกุล *Nostoc* จากแหล่งต่างๆ

รายการ (หน่วย)	*Nostoc commune*				*Nostoc flagelliforme*		
	แหล่งธรรมชาติ	เพาะเลี้ยง	แหล่งธรรมชาติ		แหล่งธรรมชาติ		
	(ดูนลำพัน)	(วว.)	(Peijing)	(Jiangsu)	(Peijing)	(Jiangsu)	(Ningxia)
ความชื้น (กรัม/100 กรัม)	10.19	12.97	8.40	14.90	13.80	13.10	12.10
โปรตีน (กรัม/100 กรัม)	20.26	20.84	18.50	14.60	20.30	20.00	21.30
เถ้า (กรัม/100 กรัม)	16.20	11.40	13.70	15.20	0.60	8.00	5.38
ไขมันทั้งหมด (กรัม/100 กรัม)	0.02	1.56	0.10	0.20	0.00	0.30	-[1]
ใยอาหาร (กรัม/100 กรัม)	43.00	2.70	1.00	3.90	3.90	2.00	-
วิตามินเอ (ไมโครกรัม/100 กรัม)	2.31	21.40	-	-	-	-	-
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.02	0.43	-	-	-	-	-
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.01	0.13	-	-	-	-	-
วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม)	ND[2]	ND	-	-	-	-	3.18
แคลเซียม (กรัม/100 กรัม)	3.55	1.54	ND	0.41	2.56	0.77	1.83
เหล็ก (กรัม/100 กรัม)	0.28	0.37	ND	0.29	0.20	0.12	0.03
กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/100 กรัม)							
Alanine	1658.27	1810.43	-	-	-	-	-
Arginine	1015.52	998.85	-	-	-	-	-
Aspartic acid	3166.21	2656.94	-	-	-	-	-
Cystine	ND	ND	-	-	-	-	-
Glutamic acid	2064.97	2613.46	-	-	-	-	-
Glycine	1044.10	1107.41	-	-	-	-	-
Histidine[3]	886.22	360.45	-	-	-	-	-
Isoleucine[3]	797.14	660.09	-	-	-	-	-
Leucine[3]	1374.11	1573.84	-	-	-	-	-
Lysine[3]	450.09	810.98	-	-	-	-	-
Methionine[3]	49.33	258.47	-	-	-	-	-
Phenylalanine[3]	1000.05	915.99	-	-	-	-	-
Proline	486.36	745.09	-	-	-	-	-
Serine	1186.14	1217.37	-	-	-	-	-
Threonine[3]	1193.92	1149.20	-	-	-	-	-
Tryptophan[3]	35.62	113.87	-	-	-	-	-
Tyrosine	446.47	660.68	-	-	-	-	-
Valine[3]	1220.93	853.87	-	-	-	-	-

[1]ไม่ได้ทำการวิเคราะห์, [2]วิเคราะห์ไม่พบ, [3]เป็นกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid)

5. การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ

ผลวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของสาหร่ายเห็ดลาบเปรียบเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูป (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูป ฉบับที่ 210 พ.ศ. 2543) พบว่า สาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติแม้จะมีการทำความสะอาดแล้ว แต่ยังมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตที่ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณยีสต์และราเกินกว่าข้อกำหนดของมาตรฐานฯ โดยไม่พบว่ามีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรคแต่อย่างใด ในขณะที่สาหร่ายเห็ดลาบจากการ

เพาะเลี้ยงมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตที่ 37 องศาเซลเซียส เกินกว่าที่กำหนด (ตารางที่ 4) อย่างไรก็ตามการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ มีกระบวนการฆ่าเชื้อที่สามารถทำลายจุลินทรีย์เหล่านี้ ซึ่งไม่ได้เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคได้

ตารางที่ 4. ผลวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง

รายการ	แหล่งธรรมชาติ		เพาะเลี้ยง	มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหาร
	สาหร่ายสด	สาหร่ายแห้ง*	สาหร่ายแห้ง*	กึ่งสำเร็จรูป
จุลินทรีย์ทั้งหมด				
- จุลินทรีย์ที่เติบโตที่ 37°C (หน่วยต่อกรัม)	$4.7x10^7$	$3.5x10^5$	$7.6x10^5$	$\leq 1x10^5$
- จุลินทรีย์ที่เติบโตที่ 55 °C (หน่วยต่อกรัม)	$1x10^3$	$1x10^3$	ตรวจไม่พบ	$\leq 1x10^5$
ยีสต์ รา และแบคทีเรีย				
- รา (หน่วยต่อกรัม)	$1.4x10^4$	$1.4x10^4$	ตรวจไม่พบ	$\leq 1x10^2$
- *Escherichia coli* (หน่วยต่อกรัม)	>1,100	240	ตรวจไม่พบ	<3
จุลินทรีย์ก่อโรค				
- *Salmonella* (/25 กรัม)	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
- *Staphylococcus aureus* (/1 กรัม)	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
- *Clostridium perfringens* (/1 กรัม)	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ
- *Bacillus cereus* (/0.1 กรัม)	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ

*หลังทำความสะอาดสาหร่ายโดยการล้างด้วยน้ำเกลือ และน้ำเปล่าแล้ว จึงทำการอบสาหร่ายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่

6. การวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนอนินทรีย์ (non-biogenic toxins) ในสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง

ทำการวิเคราะห์สารปนเปื้อนอนินทรีย์ โดยยึดหลักตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) ที่กำหนดให้อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท มีสารปนเปื้อนจำพวกปรอท ตะกั่ว สารหนู ได้ในปริมาณจำกัด ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนในสาหร่ายเห็ดลาบ เปรียบเทียบกับปริมาณสารปนเปื้อนตามพิกัดที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ แสดงในตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ แม้จะมีการปนเปื้อนจากโลหะหนัก แต่ไม่เกินค่ามาตรฐานของกระทรวงสาธารณสุข อย่างไรก็ตามการบริโภคสาหร่ายเห็ดลาบจะบริโภคในลักษณะของสาหร่ายเห็ดลาบสด หรือผลิตภัณฑ์แปรรูปที่มีการคืนตัวโดยการดูดซับน้ำเข้าสู่เซลล์ ทำให้ค่าการปนเปื้อนของโลหะหนักในสาหร่ายเห็ดลาบเมื่อคิดเป็นต่อกิโลกรัมสดแล้ว จะลดต่ำลงเป็นอย่างมากเนื่องจากสาหร่ายเห็ดลาบสดจากแหล่งธรรมชาติ และจากการเพาะเลี้ยงมีความชื้นอยู่สูงถึง 95-96% และ 97-98% ตามลำดับ

ตารางที่ 5. เปรียบเทียบปริมาณสารปนเปื้อนอนินทรีย์ในสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ

	(มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)		
	ปรอท	ตะกั่ว	สารหนู
ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529)	0.50	1.0	2.00
สาหร่ายเห็ดลาบ (แห้ง) จากแหล่งธรรมชาติ	0.02	1.0	0.38
สาหร่ายเห็ดลาบ (แห้ง) จากการเพาะเลี้ยง	0.05	1.0	0.05

7. ความเป็นพิษของสาหร่ายเห็ดลาบจากแหล่งธรรมชาติ

ผลทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสาหร่ายเห็ดลาบในหนูทดลองตามวิธีมาตรฐานของ OECD Guide lines for Testing of Chemical (1993) พบว่าหลังจากป้อนตัวอย่างทดสอบให้หนู หนูทุกตัวแสดงอาการปกติ นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในจากการชันสูตรซากหนูทุกตัวเมื่อสิ้นสุดการทดสอบ

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากตามวิธี Acute oral toxicity (Limit test) ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1993) เป็นการทดสอบเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับขนาด (dosage) และความเป็นพิษของสารทดสอบนั้นๆ สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการทดสอบความเป็นพิษระยะกึ่งเรื้อรังและเรื้อรังต่อไป การป้อนสารทดสอบแก่สัตว์ทดลองในขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จัดว่าเป็นขนาดที่สูงและหากสัตว์ทดลองไม่ตายหรือไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ภายหลังได้รับสารทดสอบ ไม่จำเป็นที่ต้องทำการทดสอบต่อโดยใช้ขนาดที่สูงกว่านี้ (EPA, 1998; Auletta, 1995) เนื่องจากผลการทดสอบโดยให้หนูทดลองได้รับตัวอย่างทดสอบสาหร่ายเห็ดลาบอบแห้ง ขนาด 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการศึกษานี้ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในหนู ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำการทดสอบต่อไปในขนาดที่สูงขึ้นกว่านี้

8. การแยกและการอนุรักษ์สายพันธุ์สาหร่ายเห็ดลาบ

สามารถแยกได้สาหร่ายเห็ดลาบสายพันธุ์เดี่ยว และเก็บรักษาไว้โดยวิธีการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว BGA เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่างๆ สำหรับการเก็บรักษาสาหร่ายเห็ดลาบแบบถาวร โดยวิธี cryopreservation ผลทดสอบความสามารถในการอยู่รอด หลังจากการเก็บรักษาในเดือนที่ 15 พบว่า สาหร่ายเห็ดลาบยังคงความมีชีวิต และอยู่รอดได้เป็นอย่างดี

9. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายเห็ดลาบ

9.1 การผลิตสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ผลการทดลองพบว่า สาหร่ายเห็ดลาบสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Bacillus subtilis* TISTR 008 ได้ดี ทั้งนี้การออกฤทธิ์โดยสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าการออกฤทธิ์โดยสารสกัดจากเซลล์ ซึ่งแสดงลักษณะการยับยั้งที่ไม่สมบูรณ์ (hazy zone) และสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงที่อายุ 30 วัน มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์สูงกว่าสารที่ได้จากน้ำเลี้ยงที่อายุ 15 วัน อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบนี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แกรมลบ (*Escherichia coli* TISTR 780 และ *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781) รวมทั้งเชื้อรา (*Aspergillus niger* TISTR 3245) ที่ใช้ทดสอบได้ ในขณะที่ตัวควบคุมบวก คือ gentamicin และ nystatin สามารถควบคุมได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา ได้ตามลำดับ ส่วนน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวควบคุมลบไม่เกิดโซนยับยั้งในจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ แสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่าสาหร่ายเห็ดลาบสร้างสารออกฤทธ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในวงแคบ คือ เฉพาะแกรมบวกเท่านั้น ในขณะที่การศึกษาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายในสกุล *Nostoc* ที่ผ่านมา พบว่า *N. muscorum* ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง (broad spectrum) (Bloor and England, 1989; Piccardi et al., 2000) รวมทั้งออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่า (damping-off) ในพืช (de Caire et al., 1990)

9.2 การผลิตสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ

หลังจากฉีดสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน (คาราจีแนน 1%) ที่อุ้งเท้าข้างขวาของหนูทุกกลุ่ม แล้ววัดความเปลี่ยนแปลงของปริมาตรของเท้าหนูที่เวลา 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารละลายมาตรฐานเฟนิลบูตาโซน ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอักเสบ (% inhibition) เป็น –2.56, 85.7 และ 73.7 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนหนูที่ได้รับสาหร่ายเห็ดลาบจากธรรมชาติพบว่ากลุ่มที่ได้รับสาหร่ายเห็ดลาบจากธรรมชาติในขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอักเสบ (% inhibition) ที่ 1 ชั่วโมง เป็น –20.5, –15.4 และ –21.4 ตามลำดับ ที่ 2 ชั่วโมง เป็น 34.0, 13.9 และ 12.7 ตามลำดับ ที่ 3 ชั่วโมง เป็น 12.6, –11.8 และ –1.6 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนหนูที่ได้รับสาหร่ายเห็ดลาบจากการเพาะเลี้ยงพบว่ากลุ่มที่ได้รับสาหร่ายเห็ดลาบจากการเพาะเลี้ยงในขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการอักเสบที่ 1 ชั่วโมง เป็น –114.0, –214.0 และ –233.3 ตามลำดับ ที่ 2 ชั่วโมง เป็น 31.4, 25.0 และ 31.1 ตามลำดับ ที่ 3 ชั่วโมง เป็น 9.3, 18.2

และ 31.1 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจากผลการทดลองนี้พบว่าสาหร่ายเห็ดลาบทั้งจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงที่ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู ไม่สามารถยับยั้งการอักเสบที่อุ้งเท้าของหนูในชั่วโมงที่ 2 และชั่วโมงที่ 3 ในขณะที่สารต้านการอักเสบมาตรฐานเฟนิลบูตาโซนสามารถยับยั้งการอักเสบบริเวณอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6. ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายเห็ดลาบในการยับยั้งจุลินทรีย์

ตัวอย่างสาร	ขนาดของโซนยับยั้ง (มิลลิลิตร)			
	B. subtilis	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*A. niger*
น้ำเลี้ยง อายุ 15 วัน	12.79	-[1]	-	-
น้ำเลี้ยง อายุ 30 วัน	21.94	-	-	-
เซลล์สกัด อายุ 15 วัน	8.95[2]	-	-	-
เซลล์สกัด อายุ 30 วัน	10.99[2]	-	-	-
Gentamicin (5 ไมโครกรัม)	11.52	12.00	8.72	ND
Nystatin (5 ไมโครกรัม)	ND[3]	ND	ND	13.67

[1] ไม่เกิดโซนยับยั้ง, [2] ยับยั้งไม่สมบูรณ์ (hazy zone), [3] ไม่ได้ทำการทดสอบ

10. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตชีวมวลสาหร่ายเห็ดลาบที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BGA และอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (BGA ดัดแปลง)

ในการทดลองเปรียบเทียบการผลิตชีวมวลสาหร่ายเห็ดลาบที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BGA และอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม คือ BGA ซึ่งดัดแปลงโดยไม่เติม NaCl เติม K_2HPO_4 เพิ่มขึ้นจาก 0.60 เป็น 0.90 กรัมต่อลิตร และลด $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ จาก 0.38 เป็น 0.095 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ของอาหารเริ่มต้นเป็น 7.5-8.0 ทำให้ได้ชีวมวลของสาหร่ายคิดเป็นน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นจากสูตร BGA จาก 12.35 เท่า เป็น 34.05 เท่าของน้ำหนักสดเริ่มต้น มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสุดท้ายจาก 2.47±0.01 เป็น 6.81±0.99 กรัม และมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจาก 8.37±0.01 เป็น 11.76±0.05% ต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าการเพาะเลี้ยงสาหร่ายเห็ดลาบในสูตรที่ไม่เติม NaCl นั้น สาหร่ายเห็ดลาบยังผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ออกมานอกเซลล์ในปริมาณมากอีกด้วย (ภาพที่ 5) ซึ่งสารดังกล่าวมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อ หรือสารเพิ่มความข้นเหนียว (thickening agent) ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือใช้เป็นสารปรับโครงสร้างดิน (soil conditioner) ในทางการเกษตร

ภาพที่ 5. ลักษณะของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยสาหร่ายเห็ดลาบบนอาหารวุ้นที่ไม่เติม NaCl ในสภาพของเหลว (ก) และเมื่อผ่านการระเหิดแห้ง (freeze-dried) (ข)

11. การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารต้นแบบจากสาหร่ายเห็ดลาบ

พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารต้นแบบจากสาหร่ายเห็ดลาบทั้งจากแหล่งธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง โดยพัฒนาอาหารทั้งสิ้น 4 ประเภท ได้แก่ อาหารคาว อาหารหวาน อาหารขบเคี้ยว และเครื่องดื่ม อาหารคาว 5 ชนิด

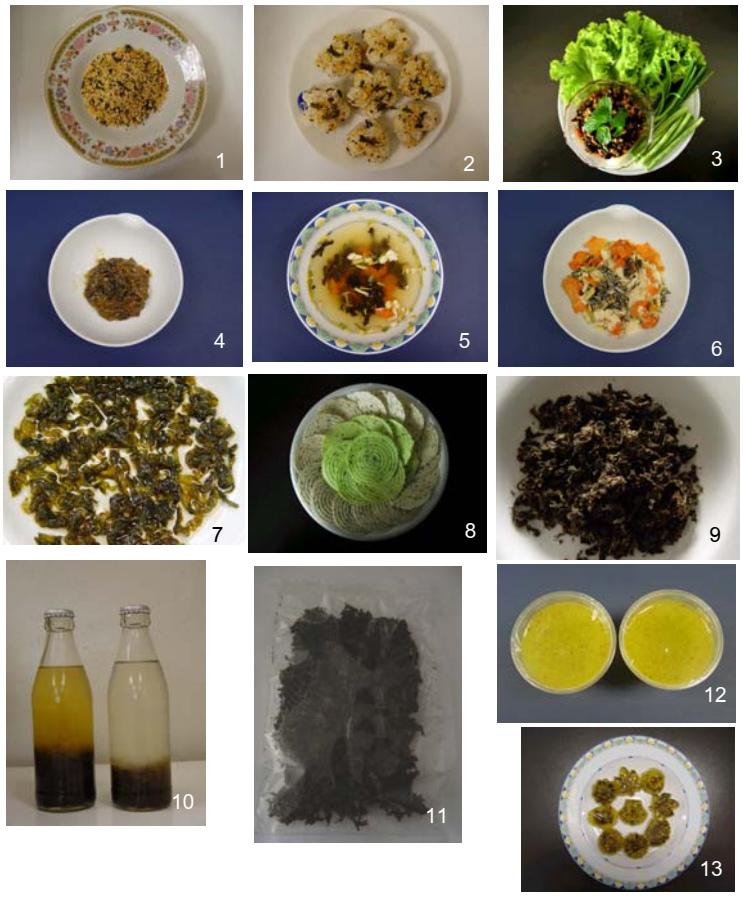
ประกอบด้วย ผงโรยข้าว ลาบ ซุปใส ซุปเต้าหู้ และสาหร่ายแผ่นดองเปรี้ยว-เค็ม อาหารหวาน 2 ชนิด ประกอบด้วย วุ้นสาหร่าย (รสชาเขียวและรสกะทิ) และเจลลี่สาหร่ายรสผลไม้ อาหารขบเคี้ยว 2 ชนิด ประกอบด้วย ทองแผ่นสาหร่าย (รสหวานและรสเค็ม) และสาหร่ายปรุงรส เครื่องดื่ม 1 ชนิด ได้แก่ น้ำข้าวผสมสาหร่ายรสผลไม้ ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 6

ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยการทดสอบกับผู้บริโภคจำนวน 30 คน โดยใช้รายงานผลการทดสอบ Hedonic Scale Test ในการเรียงลำดับความชอบของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่พัฒนาขึ้น และวิเคราะห์ผลโดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และ Means Multiple Range Test สูตรอาหารที่นำเสนอนี้เป็นสูตรอาหารที่ผู้ทดสอบมีความชอบต่อผลิตภัณฑ์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p=0.05)

ตารางที่ 7. เปรียบเทียบการผลิตชีวมวลสาหร่ายเห็ดลาบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเข้มสูตรพื้นฐาน (BGA) และสูตรอาหารที่เหมาะสม (BGA) ดัดแปลง

อาหารเลี้ยงสาหร่าย	NaCl (กรัมต่อลิตร)	K_2HPO_4 (กรัมต่อลิตร)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (กรัมต่อลิตร)	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	ค่าเฉลี่ย นน. สดสุดท้าย[1] (กรัม)	ปริมาณ นน.สดที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	อัตราการเจริญเติบโต(μ) (% ต่อวัน)
อาหารพื้นฐาน (Basal-BGA)	0.07	0.60	0.38	7.5	2.47 ± 0.01	12.35	8.37 ± 0.01
อาหารที่เหมาะสม (BGA ดัดแปลง)	0.00	0.90	0.095	7.5-8.0	6.81 ± 0.09	34.05	11.76 ± 0.05

[1] ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดเริ่มต้น 0.20 + 0.01 กรัม



ภาพที่ 6. ผลิตภัณฑ์อาหารจากสาหร่ายเห็ดลาบ 1. ผงโรยข้าว, 2. ข้าวปั้นที่ผสมกับผงโรยข้าว, 3. ลาบที่ปรุงจากผลิตภัณฑ์ต้นแบบเห็ดลาบกึ่งสำเร็จรูป, 4. ซุปเต้าหู้, 5. ซุปใส, 6. ผงซุป, 7. สาหร่ายเห็ดลาบแผ่นดองเปรี้ยว-เค็ม, 8. ทองแผ่นสาหร่ายรสหวานและรสเค็ม, 9. สาหร่ายอบแห้ง, 10. เครื่องดื่มน้ำข้าวผสมสาหร่ายรสผลไม้, 11. สาหร่ายปรุงรส, 12. เจลลี่สาหร่ายรสผลไม้ (รสสับปะรด), 13. วุ้นสาหร่ายรสชาเขียว

ตารางที่ 8. ผลิตภัณฑ์อาหารที่พัฒนาจากสาหร่ายเห็ดลาบ

ประเภทอาหาร	ชนิดของอาหาร	รูปแบบ	สาหร่ายเห็ดลาบ	
			ธรรมชาติ[1]	เพาะเลี้ยง[2]
คาว	ผงโรยข้าว (Thai dancing, furikake)	สำเร็จรูป	✓	✓
	ลาบ	กึ่งสำเร็จรูป	✓	-
	ซุปใส	กึ่งสำเร็จรูป	✓	✓
	ซุปเต้าหู้	กึ่งสำเร็จรูป	✓	✓
	สาหร่ายแผ่นดองเปรี้ยว-เค็ม	สำเร็จรูป	✓	-
หวาน	วุ้นสาหร่าย (รสชาเขียว รสกะทิ)	สำเร็จรูป	✓	✓
	เจลลี่สาหร่ายรสผลไม้	สำเร็จรูป	✓	✓
ขบเคี้ยว	ทองแผ่นสาหร่าย (รสหวาน รสเค็ม)	สำเร็จรูป	✓	✓
	สาหร่ายแผ่นปรุงรส	สำเร็จรูป	✓	-
เครื่องดื่ม	น้ำข้าวผสมสาหร่ายรสผลไม้ (สับปะรด กระเจี๊ยบ มะนาว)	สำเร็จรูป	✓	✓

[1] ลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง, [2] ลักษณะเป็นเม็ดกลม

บทสรุป

สาหร่ายเห็ดลาบจัดเป็นสาหร่ายที่มีศักยภาพสูงในการนำชีวมวลมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทั้งอาหารรูปแบบต่างๆ ที่รับประทานในชีวิตประจำวัน และอาหารเพื่อสุขภาพเนื่องจากมีใยอาหารสูง และโดยที่กระแสความนิยมในการบริโภคสาหร่ายในสังคมไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพื่อเป็นการสร้างกระแสความนิยมบริโภคทรัพยากรชีวภาพจากภูมิปัญญาไทยอันทรงคุณค่า และทดแทนการนำเข้าผลิตภัณฑ์อาหารประเภทสาหร่ายจากต่างประเทศ จึงควรมีการศึกษาเพื่อต่อยอดการวิจัยโดยพัฒนากระบวนการผลิตชีวมวลสาหร่ายเห็ดลาบในเชิงการค้าทั้งกระบวนการผลิตบนอาหารวุ้นและในอาหารเหลว เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ควรมีการวิจัยและพัฒนาการผลิตสารเพิ่มความข้นเหนียวจากสาหร่ายเห็ดลาบเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ตลอดจนสารปรับโครงสร้างดินเพื่อใช้ประโยชน์ทางการเกษตรด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_646005

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. 2529. ฉบับที่ 98.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2543. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูป ฉบับที่ 210.

อักษร ศรีเปล่ง. 2525. สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Abdelahad, N. and G. Bazzichelli. 1989. Ultrastructure and development of “coccoid cells” of *Nostoc commune* (Cyanophyta). *Br. J. Phycol.* 24: 217-22.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Method of Analysis of AOAC 16th Edition volume 1.

Auletta, C.S. 1995. Acute, Subchronic and Chronic Toxicity. *In* Michael J. Derelanko and Mannfred A. Holinger, (eds.), CRC Handbook of Toxicology, pp. 51-104. CRC Press.

Bloor, S. and R.R. England. 1989. Antibiotic production by the cyanobacterium *Nostoc muscorum. J. Appl. Phycol.* 1: 367-72.

Chmel, H. and D.B. Louria. 1980. Antifungal antibiotic: mechanism of action, resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. *In* Lorian, V. (ed.), Antibiotic in Laboratory Medicine. Academic Press, New York.

Chu, H-J. and C-T. Tsang. 1988. Research and utilization of cyanobacteria in China: a report. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80: 1-4.

de Caire, G.Z., M.S. de Cano, M.C.Z. Mulé, D.R. de Halperin and M. Galvagno. 1987. Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* on growth of *Sclerotinia sclerotiorum. Phyton* 47: 43-6.

de Caire, G.Z., M.S. de Cano, M.C.Z. Mulé and D.R. de Halperin. 1990. Antimycotic products from the cyanobacterium *Nostoc muscorum* against *Rhizoctonia solani. Phyton* 51: 1-4.

Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Botany Department, University of Madras., Published by Indian Council of Agricultural Research New Delhi, p. 686.

Dodds, W.K., D.A. Gudder and D. Mollenhauer. 1995. The ecology of *Nostoc. J. Phycol*. 31: 2-18.

Flaibani, A., Y. Olsen and T.J. Painter. 1989. Polysaccharides in desert reclamation: compositions of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue-green and unicellular green edaphic algae. *Carbohydr. Res.* 190: 235-8.

Gao, K. 1998. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: a review. *J. Appl. Phycol.* 10: 37-49.

Hoppe, H.A. 1979. Marine algae and their products and constituents in pharmacy. *In* Hoppe, H.A., T. Levring and Y. Tanaka (eds.), Marine Algae in Phamaceutical Science, Vol. 1. pp. 25-119. Walter de Gruyter, Berlin.

Hori, K., G. Ishibashi and T. Okita. 1994. Hypocholesterolemic effect of blue-green alga, ishikurage (*Nostoc commune*) in rats fed atherogenic diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* 45: 63-70.

Hoshaw, R.W. and J.R. Rosowski. 1979. Methods for microscopic algae. *In* Stein, I.R. (ed.), Handbook of Phycological Methods. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Huang, Z., Y. Liu, B.S. Paulsen and D. Klaveness. 1998. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *J. Phycol.* 34: 962-968.

Keneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell and H.M. Sommess. 1979. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. J.B. Lippinoott Company, Philadelphia.

Lazaroff, N. 1973. Photomorphogenesis and nostocacean development *In* Carr, N.G. and B.A. Whitton (eds.), The Biology of Blue-Green Algae. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 279-319.

Lembi, C.A. and J.B. Waaland. 1988. Algae and Human Affairs. Cambridge University Press, New York. 590 p.

Lund, H.C. and J.W.G. Lund. 1995. Freshwater Algae their Microscopic World Explored. Biopress Limited, England. pp. 234-237.

Organization for Economic Co-operation and Development. 1993. OECD Guidelines for testing of chemicals. Volume 2, Section 4: Health Effects, 401. Acute Oral Toxicity.

Piccardi, R., A. Frosini, M.R. Tredici and M.C. Margheri. 2000. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc. J. Appl. Phycol*. 12: 543-547.

Sinha, R.P., H.D. Kumar, A. Kumar and D-P. Häder. 1995. Effects of UV-B irradiation on growth, survival, pigmentation and nitrogen metabolism enzymes in cyanobacteria. *Acta Protozool*. 34: 187-92.

Sinha, R.P. and D-P. Häder. 1996. Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem. Photobiol*. 64: 887-96.

Takenaka, H., T. Sumiya and H. Ito. 1997. Effects of hot water extract prepared from *Nostoc flagelliforme* on macrophage activities in tumor-bearing mice. *Med. Biol.* 135: 231-4. (In Japanese)

United State Environmental Protection Agency (EPA). 1998. Prevention, pesticides and toxic substances (7101). Health effect test guidelines, OPPTS 870.1100 Acute oral toxicity, EPA 712-6-96-190.

Watanabe, M.M., A. Shimizu and K.N. Satake. 1992. NIES-Microbial Collection at the National Institute for Environmental Studies: cryopreservation and database of culture strains of microalgae. *In* Watanabe, M.M. (ed.), Proceedings of the Symposium on Culture Collection of Algae, pp. 33-42. National Institute for Environmental Studies, Environment Agency, Tsukuba.