



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* โดยใช้เทคนิค
Room-Temperature Plasma (ARTP)

Enhancing the biological activity of *Lactobacillus spp.* by Room-
Temperature Plasma (ARTP)

โดย

ผศ.ดร. พรรณนภา เกาทอง

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2566



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

การเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* โดยใช้เทคนิค

Room-Temperature Plasma (ARTP)

Enhancing the biological activity of *Lactobacillus spp.* by Room-Temperature

Plasma (ARTP)

โดย

ผศ.ดร. พรรณนภา เกาทอง

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2566

ชื่อเรื่อง : การเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* โดยใช้เทคนิค Room-Temperature Plasma (ARTP)

ผู้วิจัย : ผศ.ดร.พรรณนภา เกาทอง สถาบัน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์ : 2567 สถานที่พิมพ์: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ : สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนหน้างานวิจัย 69 หน้า คำสำคัญ: *Lactobacillus spp.* , Room-Temperature Plasma (ARTP),

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ลิขสิทธิ์: ผศ.ดร.พรรณนภา เกาทอง

บทคัดย่อ

การพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์เป็นความท้าทายสำคัญในวงการจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ การศึกษานี้มุ่งเน้นการใช้เทคโนโลยี Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* โดยเฉพาะในด้านฤทธิ์ต้านจุลชีพและการต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองเริ่มต้นด้วยการหาค่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ ARTP กับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ พบว่า *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* มีความทนทานต่อ ARTP แตกต่างกัน โดยมีช่วงเวลาที่เหมาะสมอยู่ที่ 7-9, 4-5 และ 11-12 วินาที ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยใช้วิธี DPPH anti-oxidant assay ผลการทดสอบพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *Lactobacillus* ทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดย *L. acidophilus* สายพันธุ์ LAM 12s 3(2) แสดงการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพสูงสุดถึง 60.19% นอกจากนี้ ยังพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยใช้ cell-free supernatant พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิดสูงขึ้น รวมถึงเชื้อดื้อยาเช่น *S. aureus* MRSA, *P. aeruginosa* MDR และ *E. coli* ESBL โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 6.25-50% และ 12.5-50% ตามลำดับ การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีความไวต่อยา Amikacin, Ceftriaxone และ Doxycycline เพิ่มขึ้น แต่ยังคงดื้อต่อ Vancomycin เช่นเดิม นอกจากนี้ ยังพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้น โดยมีปริมาณ Total Flavonoid Content อยู่ในช่วง 29.95-42.76 μg Quercetin equivalents

ผลการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นและมีความเสถียรมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

โดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยี ARTP สามารถใช้ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางชีวภาพของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในด้านการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลชีพ ซึ่งมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ต่อไป

Title: Enhancing the biological activity of *Lactobacillus spp.* by Room-Temperature Plasma (ARTP)

Researcher: Pannapa Powthong Ph.D.

Institution: Faculty of Science, Rangsit University

Year of Publication: 2024 Publisher: Faculty of Science, Rangsit University

Sources: Research Institute No. of page: 69 pages

Keyword: *Lactobacillus spp.* , Room-Temperature Plasma (ARTP), antibacterial activity, antioxidant activity

Copyright: Pannapa Powthong Ph.D.

ABSTRACT

The development of microorganisms with beneficial biological properties is a significant challenge in the fields of microbiology and biotechnology, particularly for lactic acid bacteria that play crucial roles in the food and medical industries. This study focuses on using Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) technology to improve the properties of *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, and *L. acidophilus*, specifically in terms of antimicrobial activity and antioxidant properties.

The experiment began by determining the optimal duration for applying ARTP to each bacterial strain. It was found that *L. plantarum*, *L. casei*, and *L. acidophilus* had different tolerances to ARTP, with optimal exposure times of 7-9, 4-5, and 11-12 seconds, respectively. Subsequently, mutant strains with higher antioxidant efficiency than the original strains were selected using the DPPH anti-oxidant assay. Test results showed that the mutant strains of all three *Lactobacillus spp.* had significantly higher antioxidant efficiency. *L. acidophilus* strain LAM 12s 3(2) demonstrated the highest increase in efficiency at 60.19%. Additionally, the mutant strains exhibited growth rates that were better than or comparable to the original strains.

Antimicrobial activity tests using cell-free supernatant revealed that the mutant strains had increased effectiveness in inhibiting various pathogenic bacteria, including drug-resistant strains such as *S. aureus* MRSA, *P. aeruginosa* MDR, and *E. coli* ESBL. The MIC and MBC values ranged from 6.25-50% and 12.5-50%, respectively.

Antibiotic susceptibility tests showed that the mutant strains had increased sensitivity to Amikacin, Ceftriaxone, and Doxycycline, but remained resistant to Vancomycin. Furthermore, the mutant strains demonstrated an increased ability to produce flavonoids, with Total Flavonoid Content ranging from 29.95-42.76 µg Quercetin equivalents.

Stability tests of the strains indicated that the mutant strains had a higher and more stable ability to produce antioxidants compared to the original strains.

In conclusion, this study demonstrates that ARTP technology can effectively improve the biological properties of *Lactobacillus* bacteria, particularly in terms of antioxidant and antimicrobial activities. This has potential applications in the food and medical industries.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้มีพระคุณหลายท่าน โดยเฉพาะ ดร. ภูมิภัสมี พุทธผดุงวิมล อาจารย์คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สละเวลาช่วยทำการทดสอบ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการจัดหาอุปกรณ์, สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่พึงได้รับจากรายงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้ทุกท่านที่มีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จของการวิจัยครั้งนี้

ผศ.ดร.พรรณนภา เกาทอง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญรูปภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
2.1 คุณสมบัติทั่วไปของ <i>Lactobacillus</i> spp.	4
2.2 บทบาทในอาหาร	4
2.3 สายพันธุ์ของ <i>Lactobacillus</i> ที่สำคัญ	5
2.4 ประโยชน์ของสายพันธุ์ <i>Lactobacillus</i>	6
2.5 โทษของแบคทีเรียสายพันธุ์ของ <i>Lactobacillus</i>	6
2.6 เทคนิคการให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม	7
2.7 เทคนิคการกลายพันธุ์ Atmospheric And Room-Temperature Plasma (ARTP)	9
2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	12
3.1 กรอบแนวคิดการวิจัย	12
3.2 การออกแบบการวิจัย	12
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์	12
3.4 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ	14
3.5 วิธีการทดลอง	16
3.5.1 การเตรียมสายพันธุ์ mutant	16
3.5.2 การทดสอบเสถียรภาพของการเจริญเติบโตและคุณสมบัติของ	17
สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	
3.5.3 การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วย Agar well	17
diffusion	
3.5.4 การตรวจสอบความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วย	18
เทคนิค Microdilution	
3.5.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้	18
3.5.6 การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ	19
3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content)	19
3.5.8 การศึกษาความไวต่อยา	20
3.5.9 Strain Stability	20
3.6 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
4.1 ผลการทดสอบการเตรียม <i>Lactobacillus</i> สายพันธุ์ mutant	21
4.2 ผลการทดสอบการคัดเลือก candidates ของ <i>Lactobacillus</i> spp.	23
ทั้ง 3 สายพันธุ์	
4.3 ผลการทดสอบเสถียรภาพของการเจริญเติบโต (Growth Curve)	27
4.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของ	32
cell-free supernatant ด้วย Agar well diffusion	

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ cell-free supernatant ด้วยเทคนิค Broth Microdilution	37
4.6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ	39
4.7 ผลการทดสอบการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค DPPH inhibition test	43
4.8 ผลการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content)	48
4.9 ผลการทดสอบการทดสอบ Strain Stability	50
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้วิจัย	74



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ <i>Lactobacillus plantarum</i> wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion	34
4.2 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ <i>Lactobacillus casei</i> wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion	35
4.3 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ <i>Lactobacillus acidophilus</i> wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion	36
4.4 ผลการทดสอบ Broth microdilution ใน <i>Lactobacillus plantarum</i>	38
4.5 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
4.6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>Lactobacillus casei</i>	41
4.7 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>Lactobacillus acidophilus</i>	42
4.8 แสดงผลการทดสอบ DPPH ของ cell-free supernatant ใน <i>Lactobacillus</i> spp.	47
4.9 แสดงผลการทดสอบการวิเคราะห์ Total Flavonoid Content ใน <i>Lactobacillus</i> spp.	49

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
4.1 เปรียบเทียบระหว่างอัตราการตายและระยะเวลาที่ใช้การ expose ARTP ของแบคทีเรีย <i>Lactobacillus</i> ที่นำมาทดสอบ	22
4.2 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ wild type และ candidates isolated ของ <i>Lactobacillus plantarum</i>	24
4.3 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ wild type และ candidates isolated ของ <i>Lactobacillus casei</i>	25
4.4 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ wild type และ candidates isolated ของ <i>Lactobacillus acidophilus</i>	26
4.5 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
4.6 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus casei</i>	30
4.7 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่าง wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus acidophilus</i>	31
4.8 ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน <i>Lactobacillus plantarum</i> wild type และ mutant type	44
4.9 ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน <i>Lactobacillus casei</i> wild type และ mutant type	45
4.10 ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน <i>Lactobacillus acidophilus</i> wild type และ mutant type	46

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.11	ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus plantarum</i> เป็นเวลา 15 generations	66
4.12	ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus casei</i> เป็นเวลา 15 generations	67
4.13	ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรีย wild type และ mutant type ของ <i>Lactobacillus acidophilus</i> เป็นเวลา 15 generations	68

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ARTP	=	Atmospheric and room temperature plasma
CFS	=	Cell-free supernatant
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	=	Free radical scavenging activity
LP non	=	<i>Lactobacillus plantarum</i> wild type
LPM	=	<i>Lactobacillus plantarum</i> mutant
LC non	=	<i>Lactobacillus casei</i> wild type
LCM	=	<i>Lactobacillus casei</i> mutant
LA non	=	<i>Lactobacillus acidophilus</i> wild type
LAM	=	<i>Lactobacillus acidophilus</i> mutant
MIC	=	Minimum Inhibitory Concentration
MBC	=	Minimum Bactericidal Concentration
VCEAC	=	Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity
ESBL	=	Extended Spectrum β -lactamases
VRE	=	Vancomycin Resistance <i>Enterococci</i>
MDR	=	Multidrug Resistant
MRSA	=	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
μg	=	Microgram
mg/mL	=	Milligram per milliliter
$\mu\text{g/mL}$	=	Microgram per milliliter
mm	=	Millimeter
SD	=	Standard Deviation

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาของปัญหา

ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา, โปรไบโอติกแบคทีเรียได้รับความสนใจมากมายเนื่องจากมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลากหลายด้าน และหนึ่งในนั้นคือสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* ซึ่งเป็นสายพันธุ์สำคัญที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหารและสุขภาพทางโภชนาการโดยรวม สปีชีส์ *Lactobacillus spp.* ที่เป็นที่รู้จัก เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, และ *Lactobacillus rhamnosus*, ถูกนำมาศึกษากันอย่างแพร่หลายถึงคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพในหลากหลายด้าน

Lactobacillus spp., เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย Gram-positive สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยในอาหารหมักและระบบทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะของมนุษย์ ที่มีความสามารถในการครอบครองพื้นที่ส่วนใหญ่ในทางเดินอาหารของมนุษย์ และเป็นที่รู้จักกันว่า สามารถให้ประโยชน์ต่อสุขภาพในหลายด้านเมื่อบริโภค, เช่น การสนับสนุนการทำงานของระบบทางเดินอาหารและระบบภูมิคุ้มกัน, การสนับสนุนสมดุลของลำไส้และการดูดซึมสารอาหาร, ตลอดจนถึงการมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ซับซ้อน และช่วยรักษาสมาคมจุลินทรีย์ในร่างกาย จึงได้ถูกนำมาศึกษาอย่างละเอียดถึงผลกระทบต่อสุขภาพของโฮสต์ในรูปแบบต่างๆ อย่างไรก็ตาม, ถึงแม้จะมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับประโยชน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อย่างแพร่หลาย แต่ถ้ายังสามารถปลดล็อกศักยภาพทรัพยากรของ *Lactobacillus spp.* ที่เพิ่มขึ้น ทำให้เข้าถึงความสามารถในสร้างประโยชน์ทางการรักษาได้อย่างเต็มรูปแบบหรือการเพิ่มกิจกรรมทางชีวภาพทางธรรมชาติของสายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ เช่น การนำสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประโยชน์นี้ผ่านวิธีการนวัตกรรมเทคนิคการกลายพันธุ์ที่น่าสนใจและปลอดภัย จะทำให้ความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพโปรไบโอติก เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยอาหารและระบบภูมิคุ้มกันของมันเพิ่มขึ้นได้นั้น ยังต้องอาศัยการศึกษาถึงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีการหรือนวัตกรรมที่เพิ่มประสิทธิภาพแบคทีเรียเหล่านี้ให้มากขึ้น

ในช่วงสองสามปีที่ผ่านมา มีการนำเทคนิคนวัตกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพของแบคทีเรียด้วยการกลายพันธุ์ที่รู้จักกันในชื่อว่า Room-Temperature Plasma (ARTP) ได้รับความสนใจมากในบริบทของจุลชีววิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยา โภชนาการ และวิทยาการแพทย์ วิธีนี้จะให้

ทางเลือกที่รวดเร็ว ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและความแข็งแกร่งของมัน

ลักษณะเฉพาะของเทคโนโลยี Room-Temperature Plasma (ARTP) คือความสามารถในการกำหนดลักษณะทางชีวภาพได้ตรง โดยทำให้เกิดการแตกของซีอีไอแอลดีเอและโพลิโกนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ การควบคุมปริมาณของพลาสมายังทำให้เกิดการกำหนดของกลุ่มการกลายพันธุ์ที่หลากหลาย, แต่ละกลุ่มมีผลกระทบที่แตกต่างกันต่อฟังก์ชันของโปรไบโอติกที่มีผลต่อการปรับปรุงกิจกรรมทางชีวภาพของ *Lactobacillus spp.* ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบโดยใช้ระบบการกลายพันธุ์ ARTP ที่ใช้อาร์กอนเป็นแหล่งกำเนิดมีผลต่อ *Lactobacillus spp.* อย่างไร โดยมีเป้าหมายการปรับปรุงกิจกรรมทางชีวภาพของ *Lactobacillus spp.* และจะคัดเลือกกลุ่มแบคทีเรียกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ และสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วนำมาใช้ในการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ ทำให้เกิดความก้าวหน้าไปในการใช้ประโยชน์จากสเปกตรัมทั้งหมดที่โปรไบโอติกนี้ที่จะก่อให้เกิดผลลัพธ์ของการวิจัยนี้มีศักยภาพที่จะทำให้มีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อใช้ในอาหารเสริม, และทางการแพทย์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ตรวจสอบผลของการใช้ Room-Temperature Plasma (ARTP) ต่ออัตราการรอดชีวิตของ *Lactobacillus spp.* โดยวัดจากความสามารถในการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียหลังจากการได้รับการรักษาด้วย ARTP ในระยะเวลาที่กำหนด
2. ประเมินผลของการใช้เทคนิค ARTP ต่อความสามารถในการทำงานและกิจกรรมของ *Lactobacillus spp.* เช่น คุณสมบัติด้าน anti-oxidant และ anti-microbial

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร cell free solution โดยอาศัยการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพรูปแบบต่างๆ ภายใต้สภาวะหลอดทดลอง (*in vitro*) เท่านั้น

สมมติฐานการวิจัย

1. คุณสมบัติการต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ของเชื้อ *Lactobacillus spp.* gene mutations แตกต่างจากเชื้อที่เป็น wild type
2. คุณสมบัติการสร้างสาร antioxidant ของเชื้อ *Lactobacillus spp.* gene mutations แตกต่างจากเชื้อที่เป็น wild type

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นได้ ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ในผลิตภัณฑ์โภชนาการและยา
2. ช่วยเสริมสร้างสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น คุณสมบัติด้าน anti-oxidant และ anti-microbial ที่สามารถส่งเสริมสุขภาพของร่างกายได้
3. สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์โภชนาการที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น อาหารเสริมที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมสุขภาพลำไส้หรือการบำรุงรักษาระบบภูมิคุ้มกัน
4. หากสามารถพัฒนา *Lactobacillus spp.* ให้มีความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้และต้านทานการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอื่น อาจช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติทั่วไปของ *Lactobacillus spp.*

จีโนส *Lactobacillus* เป็น แบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อนเดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายสั้นไม่สร้างสปอร์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่บางชนิดชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ จัดอยู่ในกลุ่ม lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลแล็กโทส (lactose) ให้เกิดกรดแล็กติก (lactic acid fermentation) มักพบร่วมกับ *Leuconostoc* มีทั้งที่เป็น Homofermentative และ Heterofermentative Lactic Acid Bacteria และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดแบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และพบได้ทั่วไปในธรรมชาติมีทั้งที่เป็น normal flora ของร่างกาย เช่น *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus fermentum* ที่พบได้ในช่องปาก พบ *L.acidophilus* และ *L. fermentum* ในกระเพาะอาหารและลำไส้ใหญ่ ทางเดินอาหารของคนและสัตว์หรืออาหารหมักดองต่าง ๆ แลคโตบาซิลลัสที่เป็นเชื้อก่อโรคก็มี เช่น *L.casei subsp. Rhamnosus* ซึ่งก่อให้เกิดโรค Bacterial endocarditis, Systemicsepticemia และ Abscess ได้ ดังนั้นจึงมีการจัดจำแนกเชื้อกลุ่มนี้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพ แหล่งคาร์บอน (carbon sources) ลักษณะทางโภชนาการ (nutritional characteristics) ช่วงอุณหภูมิที่เจริญ (temperature range) (Orla and Jensen, 1919; 1942; 1943)

จุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกได้แก่ แบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, ส่วนใหญ่แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถที่จะสร้างกรดแล็กติก (lactic acid bacteria) รวมทั้งยีสต์รา เช่น *Saccharomyces spp.* (Kiein et al, 1998) (Salminen, and von Wright, 2019)

2.2 บทบาทในอาหาร

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในอาหาร มีบทบาทสำคัญคือ

2.2.1 เพื่อถนอมอาหาร (food preservation) ด้วยการหมัก (fermentation) ใช้เพื่อการผลิตอาหารหมักหลายประเภท ได้แก่

- ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากน้ำนม เช่น โยเกิร์ต (yogurt) น้ำนมเปรี้ยว (fermented milk)
- ผลิตภัณฑ์หมักจากเนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกอีสาน ซาลามิ (salami)

- ผลิตภัณฑ์หมักจากผักผลไม้ เช่น ผักดอง ผลไม้ดอง กิมจิ (kimchi) แตงดอง (pickle) ซาวเคราท์ (Sauerkraut)

2.2.2 เป็นสาเหตุทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ของอาหารหลายชนิด เช่น อาหารกึ่งแห้ง การเสื่อมเสียของน้ำนม การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ โดยทำให้เกิดรสเปรี้ยว และเกิดเมือกในน้ำนม เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก แฮม และเบคอน

2.3 สายพันธุ์ของแล็กโทบาซิลลัสที่สำคัญ (Plaza-Daz, 2019; Nichapha, 2557)

- *Lactobacillus bulgaricus* ใช้ในการหมักโยเกิร์ต เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ผลิตแอซีทาลดีไฮด์ (acetyldehyde) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสของน้ำนมหมัก และสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งจะย่อยโปรตีน (protein) ในน้ำนมให้ได้กรดอะมิโน (amino acid) โดยเฉพาะฮิสทีดีน (histidine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่กระตุ้นการเจริญของ *Streptococcus thermophilus*
- *Lactobacillus acidophilus*: มีบทบาทในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหาร เชื่อมโยงกับการบรรเทาอาการท้องผูกและรักษาการท้องเสีย
- *Lactobacillus casei*: เป็นส่วนสำคัญของภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหาร มีบทบาทในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในลำไส้ มีฤทธิ์ป้องกันโรคและมีบทบาทในการบรรเทาอาการท้องผูก
- *Lactobacillus reuteri*: เชื่อมโยงกับการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร มีบทบาทในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในช่องปาก
- *Lactobacillus plantarum*: ช่วยสร้างเสริมสุขภาพให้แข็งแรง มีบทบาทในกระบวนการย่อยอาหารในทางเดินอาหาร
- *Lactobacillus fermentum*: มีบทบาทในการควบคุมเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร มีฤทธิ์ทางภูมิคุ้มกัน
- *Lactobacillus salivarius*: พบในน้ำลายและช่องปาก มีประโยชน์ในการบรรเทาอาการท้องผูกและลดความเสี่ยงของการติดเชื้อในช่องปาก
- *Lactobacillus johnsonii*: มีบทบาทในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร และมีบทบาทในควบคุมเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในช่องปาก
- *Lactobacillus brevis*: ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง มีความสามารถในการทนทานต่อแอลกอฮอล์ มีประโยชน์ในการหลีกเลี่ยงการเกิดแผลในระบบทางเดินอาหาร

- *Lactobacillus rhamnosus*: ช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร มีประโยชน์ในการลดอาการแพ้

2.4 ประโยชน์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ของแล็กโทบาซิลลัส

2.4.1 บทบาทในระบบทางเดินอาหาร:

- *Lactobacillus* เป็นส่วนหนึ่งของภูมิคุ้มกันธรรมชาติในกระบวนการย่อยอาหารที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหาร โดยช่วยในการหลีกเลี่ยงการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่อาจมีความเสี่ยงต่อระบบทางเดินอาหาร
- *Lactobacillus* มีบทบาทในการสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในลำไส้ ซึ่งช่วยในกระบวนการย่อยอาหารและดูดซึมสารอาหารในลำไส้ตลอดเวลา

2.4.2 บทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน:

- *Lactobacillus* มีฤทธิ์การป้องกันโรค โดยสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียหรือสารพิษที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์
- *Lactobacillus* มีศักยภาพในการป้องกันหรือช่วยในการรักษาโรคบางประการ เช่น การช่วยลดอาการของทารกที่เป็นโรคภูมิแพ้ (atopic dermatitis) หรือการช่วยลดอาการของการติดเชื้อที่เป็นมะเร็ง.

2.4.3 การให้ประโยชน์ในสุขภาพสตรี:

- *Lactobacillus* ช่วยลดความเสี่ยงของการติดเชื้อที่อาจเกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหารของผู้หญิง
- *Lactobacillus* มีบทบาทในการสนับสนุนทรงอนามัยในระบบทางเดินปัสสาวะไปจนถึงระบบภูมิคุ้มกัน

2.4.4 การใช้ในอาหารเสริม:

- *Lactobacillus* มักถูกใส่ในอาหารเสริมเพื่อสนับสนุนการทำงานของระบบทางเดินอาหาร
- การบริโภค *Lactobacillus* ในรูปแบบอาหารเสริมอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการดูแลสุขภาพทั่วไป

2.4.5 บางสายพันธุ์ของ *Lactobacillus casei* สามารถผลิตวิตามินและสารอาหารบางประการที่สำคัญต่อร่างกาย

2.5 โทษของแบคทีเรียสายพันธุ์ของแล็กโทบาซิลลัส

- *L. brevis* สามารถเป็นตัวเชื่อมต่อไปยังแผลในระบบทางเดินอาหารทำให้มีโอกาสดูดเชื้อและเกิดการติดเชื้อในบางกรณี

- *L. brevis* มีความทนทานต่อแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อในสภาพแวดล้อมที่มีแอลกอฮอล์สูง
- *L. acidophilus* สามารถทำให้ผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ
- *L. acidophilus* มีผลต่อการใช้ร่วมกับยาบางชนิด ทำให้ยาไม่ได้ผลหรือเกิดปฏิกิริยาที่คาดไม่ถึง
- *L. acidophilus* ส่งผลต่อระบบทางเดินอาหารและทำให้เกิดปัญหาสุขภาพได้

2.6 เทคนิคการให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่ม (random mutagenesis)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมใน DNA ของสิ่งมีชีวิต การกลายพันธุ์แบบสุ่มมีข้อได้เปรียบเมื่อไม่ทราบตำแหน่งของยีนที่ต้องการหรือเมื่อระบบการควบคุมยีนที่ซับซ้อน ทุกเครื่องมือที่ใช้ในการกลายพันธุ์แบบสุ่มมีความเสี่ยงที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปมีหลายวิธีที่ใช้แต่ละวิธีมีข้อได้เปรียบและข้อเสียต่างกัน ดังต่อไปนี้

2.6.1 สารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Chemical Mutagens):

- ข้อได้เปรียบ:
 - ความหลากหลาย: สารเคมีสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่หลากหลาย เช่น base substitutions, frame-shift mutations และอื่น ๆ
 - การใช้งานง่าย: สารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีมีความง่ายต่อการใช้งานและสามารถพร้อมกันได้ทีละมากๆ
- ข้อเสีย:
 - ความจำเพาะ: อาจมีผลกระทบต่อลำดับที่เฉพาะเจาะจง ทำให้การเปลี่ยนแปลงแบบ biased mutagenesis ได้
 - ความเป็นพิษ: สารเคมีบางชนิด เช่น อีธิเดียม โบรไมด์และโซเดียมอะไซด์สามารถทำให้ผู้ใช้ได้รับความเสี่ยงจากสารพิษในระดับสูงหรือสูงมาก

2.6.2 UV Radiation:

- ข้อได้เปรียบ:
 - ไม่เฉพาะเจาะจง: รังสี UV ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มทั่วทั้งสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต
 - การจัดการทดสอบ: การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV มีความง่ายต่อการทดสอบ
- ข้อเสีย:

- การจำกัดการแพร่กระจาย: รังสี UV มีประสิทธิภาพน้อยต่อสิ่งมีชีวิตที่ใหญ่ขึ้นหรือสิ่งมีชีวิตที่มีเนื้อเยื่อปกคลุมหลายชั้น
- ความเป็นพิษต่อเซลล์: รังสี UV ปริมาณสูงของ สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ที่มีชีวิตได้

2.6.3 X-ray และ Gamma-ray Irradiation:

- ข้อได้เปรียบ:
 - การแพร่กระจาย: รังสี X-rays และรังสี แกมมา สามารถแพร่กระจายเข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่ใหญ่ขึ้นหรือสิ่งมีชีวิตที่มีเนื้อเยื่อปกคลุมหลายชั้น
 - Random Mutations: รังสี X-rays และรังสี แกมมา สามารถเหนี่ยวนำทำให้เกิดการกลายพันธุ์ทั่วทั้งสารพันธุกรรมได้ทั้งเซลล์
- ข้อเสีย:
 - อุปกรณ์และความปลอดภัย: ต้องใช้อุปกรณ์ที่พิเศษและมีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ การสร้างรังสีต้องใช้เครื่องมือที่ใหญ่และมีราคาสูง ความรู้ทางพิเศษและมีมาตรการความปลอดภัยอื่น ๆ เพื่อจำกัดการเข้าถึง

2.6.4 Transposon Mutagenesis:

- ข้อได้เปรียบ:
 - Insertional Mutagenesis: สารพันธุกรรมจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มที่ตำแหน่งต่าง ๆ โดยไม่ได้รับผลกระทบ
- ตัวบ่งชี้ที่สามารถเลือกได้: มักจะรวมถึงตัวบ่งชี้ที่สามารถเลือกได้เพื่อการระบุตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ได้
- ข้อเสีย:
 - ความหลากหลายของการกลายพันธุ์จำกัด: การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจะถูก จำกัดไว้ที่พื้นที่ที่ transposon ใส่ไว้เท่านั้น
 - ผลกระทบของตำแหน่ง: ตำแหน่งที่ถูก transposon ใส่ อาจมีผลให้เกิดการกลายพันธุ์ที่รุนแรงได้

2.6.5 Error-Prone PCR:

- ข้อได้เปรียบ:
 - Targeted Mutagenesis: สามารถใช้ในการกลายพันธุ์แบบระบุการเป้าหมายได้

- ควบคุมความสามารถในการกลายพันธุ์: สามารถควบคุมอัตราการกลายพันธุ์ได้โดยการปรับเปลี่ยนเงื่อนไข PCR
- ข้อเสีย:
 - ความหลากหลายของการกลายพันธุ์จำกัด: มักจะเป็นการกลายพันธุ์แบบ base substitutions มากกว่า diverse mutations
 - การกลายพันธุ์แบบหวังผล: การกลายพันธุ์รูปแบบนี้ทำให้เกิดผลลัพธ์ที่เป็นไปได้มากกว่าการกลายพันธุ์ประเภทอื่น ๆ

2.6.6 DNA Shuffling

- ข้อได้เปรียบ:
 - Recombination of Variants: สร้างความหลากหลายผ่านการ recombination ของ homologous DNA
 - Directed Evolution: มีประโยชน์ในการทดลองพัฒนาแบบ evolution experiments
- ข้อเสีย:
 - การทดสอบยุ่งยาก: กระบวนการนี้อาจมีความยุ่งยากและต้องใช้เวลาในการทำทดสอบ
 - ความเป็นไปได้ที่ถูกต้องไว้น้อย: สร้างความผันผวนตามที่มีการตั้งไว้น้อยลงในกลุ่มตัวอย่างเริ่มต้น

2.7 เทคนิคการกลายพันธุ์ Room-Temperature Plasma (ARTP)

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสำหรับการกลายพันธุ์ในทางชีววิทยา โดยใช้พลาสมาในบรรยากาศและอุณหภูมิห้องเป็นตัวสร้างการกลายพันธุ์ โดยใช้เครื่องกำเนิดไฟฟ้าสูงเพื่อสร้างออกซิเจนไอออนแบบพลาสมาชีวภาพ เพื่อกระตุ้นลักษณะทางชีวภาพที่เป้าหมายโดยการทำให้เกิดการแตกของเพปไทด์ DNA และออลิโกนิวคลีโอไทด์ เป็นเทคนิคการกลายพันธุ์แบบสุ่มที่ได้รับความนิยม ซึ่งได้รับการพัฒนาจากวิธีทางกายภาพที่ทำให้เกิดความเสียหายในเอ็นได้มากขึ้น มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า UV และสารเคมีกลายพันธุ์ ซึ่งจะสร้างประสิทธิภาพในการกลายพันธุ์แบบที่เรีย โดยเทคนิคนี้สามารถใช้กับแบคทีเรียที่มีความยากลำบากในการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่น ๆ ได้ เนื่องจากมีผลลัพธ์ที่รวดเร็ว ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสูงโดยมีการเอนจิที่ต่ำ การกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์โดยใช้เทคโนโลยี ARTP นี้มีข้อได้เปรียบมากมาย เช่น ความปลอดภัยในการดำเนินงาน ต้นทุนต่ำ และอุณหภูมิของพลาสมาที่ต่ำ ความสะดวกสบายในการสร้าง พลาสมาประเภทนี้ ทำให้เกิดการทำลายแบบทันทีของสาย DNA ทั้งในอุณหภูมิห้องและบรรยากาศปกติ วิธีนี้ได้รับการใช้งานอย่าง

แพร่หลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตและความแข็งแกร่งให้กับแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช ถูกเปรียบเทียบกับวิธีการกลายพันธุ์อื่น ๆ เช่น NTG หรือ การกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ระบบกลายพันธุ์ ARTP มีประสิทธิภาพสูง เป็นเทคนิคการกลายพันธุ์แบคทีเรีย การศึกษาก่อนหน้าพบว่า ARTP สามารถปรับปรุงการเพิ่มคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง (Ottenheim *et. al.*, 2018) แม้ว่าเหตุผลที่แท้จริงของกลไกการกลายพันธุ์ของระบบ ARTP ยังไม่ได้รับการความเข้าใจอย่างชัดเจน แต่การสร้างรังสี UV ร่วมกับ reactive species ที่น่าจะเป็นกลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Li *et. al.*, 2008) Reactive chemical species ที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเบส DNA และยังเหนี่ยวนำให้เกิด ทำให้เกิด single- or double-strand breaks อีกด้วย (Arjunan *et. al.*, 2015)

2.7.1 ข้อดีของเทคนิค ARTP

- 1) เพิ่มประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ ARTP สามารถทำให้การกลายพันธุ์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ
- 2) ไม่ใช้สารเคมี ไม่ต้องใช้สารเคมีที่อาจมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตหรือสิ่งแวดล้อม
- 3) ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่หลากหลาย, ที่อาจสร้างลักษณะที่พิเศษหรือประโยชน์ต่อการใช้งาน
- 4) ลดเวลาและความยุ่งยากในการวิจัย ลดเวลาที่ใช้ในกระบวนการวิจัยและความยุ่งยากทางเทคนิค

2.7.2 ข้อเสียของเทคนิค ARTP

- 1) ความไม่แน่นอนในการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่แน่นอนและไม่สามารถทำนายล่วงหน้าได้
- 2) การเปลี่ยนแปลงที่ไม่ต้องการ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่ไม่ต้องการหรือไม่พึงประสงค์
- 3) ต้องการการทดสอบเพิ่มเติม ต้องทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่ได้จาก ARTP เพื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นและคุณสมบัติที่ต้องการ
- 4) ความซับซ้อนของกระบวนการ กระบวนการ ARTP ต้องการการควบคุมและการทำงานที่ซับซ้อนมาก, ทำให้ต้องใช้ความเชี่ยวชาญทางวิทยาศาสตร์

2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Xu และคณะรายงานว่า การกลายพันธุ์ของ *Bacillus amyloliquefaciens* ด้วย ARTP ทำให้มีอัตราการตายประมาณ 95% ที่ 100 วินาที โดยที่มี positive mutant เพิ่มการผลิต menaquinone-7 ได้ 4.25 เท่า (Xu *et. al.*, 2017)

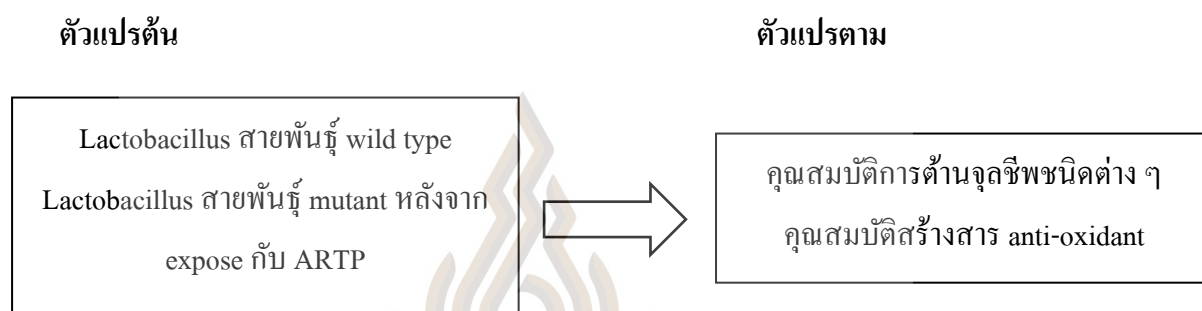
การศึกษาของ Zhu และคณะ ใช้ ARTP ที่มีแหล่งสร้าง ARTP จากก๊าซฮีเลียม ใน *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 150 วินาที โดยใช้การตอบสนองทางสีเป็นเกณฑ์ในการเลือกเชื้อสายที่ผลิต surfactin พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ได้มากถึง 27,000 สายพันธุ์ และมีเชื้อกลายพันธุ์ 37 สายพันธุ์ที่ผลิต surfactin ได้สูง และพบเชื้อกลายพันธุ์ที่เพิ่มการสังเคราะห์ surfactin ได้ 5.4 เท่า และตัวแปร C15 surfactin variant ผลิตออกมามากเมื่อเทียบกับ wild type (Zhu *et. al.*, 2017)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 กรอบแนวคิดการวิจัย



3.2 การออกแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยประเภทการพัฒนาทดลองในสาขาสัตวศาสตร์ โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยเชิงทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวภาพในด้านต่าง ๆ ของ *Lactobacillus* สายพันธุ์ mutant หลังจาก expose กับ ARTP โดยทำการทดสอบ เพื่อหาความแตกต่างของคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรคทางการแพทย์และคุณสมบัติสร้างสาร anti-oxidant ว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องมือ

Incubator	binder/Germany
Raminaflow	FASTER/Germany
Candle jar	United Science Co.,Ltd/Thailand
เครื่อง Autoclave	Tomy, SS-325/Japan
เครื่อง Centrifuge	Sanyo,Harrier/UK, Hettich, Micro200R/Germany
เครื่อง Vortex mixer	Gemmy Industrial corporation, VM-300/Taiwan
เครื่อง pH meter	Metrohm, 713 pH meter/Switzerland
เครื่อง Spectrophotometer	Thermo spectronic, Genesys 20/USA
Water bath	Julabo, TW12/Germany

เครื่องชั่ง Ohaus, ARC120/USA

Hot air oven Heraeus/USA

Hemocytometer

3.3.2 อุปกรณ์

Erlenmeyer flask ขนาด 100, 500, 1000 ml	:Pyrex/USA
กระบอกตวง (Cylinders)	:Pyrex/USA
เบ็กเกอร์ (Beakers)	:Pyrex/USA
Sterile cotton swab	:Nited Science Co.,Ltd/Thailand
Inoculating loop	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Forceps	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Needle	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Dropper	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Glass slide	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Tip	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Spreader	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Auto pipette	:SARTORIUS/Germany
Test Tube Racks	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Eppendorf	:United Science Co.,Ltd/Thailand
Sterile Syringe Filters Size: 18mm, 0.45um	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ตะเกียงแอลกอฮอล์	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ช้อนตักสาร	:DEX/Thailand
แผ่นกระดาษกรองปลอดเชื้อ	:Advantec/Japan
กระดาษชั่งสาร	:United Science Co.,Ltd/Thailand
แพ่งแก้ว	:United Science Co.,Ltd/Thailand
ไม้จิ้มฟัน	:PATUM/Thailand
ถุงพลาสติก	:PATUM/Thailand
จานเพาะเชื้อ	:HI VAN/USA
Freezing vial	:United Science Co.,Ltd/Thailand
96-well microtiter plate	: Nunc Co.,Ltd/Thailand
Sterile microtiter plate	:Nunc Co.,Ltd/Thailand

3.4 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

Sodium chloride	: QReC New Zealand
Oxidase	: Fluka Analytical/USA
Catalase	: HERCK/Germany
3% H ₂ O ₂	: QReC New Zealand
KCl	: HERCK/Germany
Phosphate buffer saline	: Mallinckrodt/USA and M&B/England
NaHCO ₃	: UNILAB/Australia
Gentamicin	: SIGMA/ USA
Bromocresol purple	: UNILAB/Australia
Crystal violet	: UNILAB/Australia
Di-ammonium hydrogen citrate	: Lepont de clix/France
Di-potassium hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Di-sodium hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Ethanol 70%, 95%	: UNILAB/Australia
Glucose	: Lepont de clix/France
Gram's iodine	: Bio-Medical Laboratory/Thailand
Glycerol	: Lepont de clix/France
Hydrogen chloride	: Lepont de clix/France
Magnesium sulfate heptahydrate	: AJAX Chemicals/France
Aluminum trichloride solution	: AJAX Chemicals/France
Potassium di-hydrogen phosphate	: Lepont de clix/France
Safranin O	: MERCK/France
Sodium hydroxide	: Lepont de clix/France
Tri-sodium acetate Toluene	: Lepont de clix/France
resazurin	: SIGMA/ USA
glacial acetic acid	: SIGMA/ USA

3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารทดสอบชีวเคมี

- 1.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Trypticase soy agar
2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Trypticase soy broth

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว RPMI 1640 medium
4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Potato dextrose agar
5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hilton agar
6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hilton broth
7. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง de Man, Rogosa และ Sharpe agar
8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว de Man, Rogosa และ Sharpe broth

3.3.5 Disk ยาในการทดสอบ

- 1) Cefoxitin
- 2) Ceftriaxone
- 3) Ciprofloxacin
- 4) Doxycycline
- 5) Erythromycin
- 6) Gentamycin
- 7) Imipenem
- 8) Vancomycin

3.3.6 แบคทีเรียที่ก่อโรคทางการแพทย์หรือแบคทีเรียดื้อยาที่ใช้ในการทดสอบ มีทั้งสิ้น 9 สายพันธุ์ คือ

กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วย

- 1) *Escherichia coli* (1 isolates: *Escherichia coli* ESBL producing strain),
- 2) *Enterococcus faecalis* (1 isolate: vancomycin-resistant enterococci)
- 3) *Aeromonas hydrophila* (1 isolate: clinical isolate)
- 4) *Salmonella Typhi* (1 isolate: clinical isolate)
- 5) *Klebsiella pneumoniae* (1 isolate: *Klebsiella pneumoniae* ESBL producing strain)
- 6) *Acinetobacter baumannii* (1 isolate: *Acinetobacter baumannii* Multidrug resistant)
- 7) *Pseudomonas aeruginosa* (1 isolates: *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug resistant)

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากคณะวิทยาศาสตร์และคณะเทคนิคการแพทย์ ม.รังสิต การควบคุมคุณภาพเชื้อทดสอบในกลุ่ม drug resistant ทำได้โดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพตามหลัก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2017)

กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย

- 1) *Staphylococcus aureus* (1 isolates: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA))
- 2) *Bacillus subtilis* (1 isolate: clinical isolate),

3.3.7 เชื้อราที่ก่อโรคทางการแพทย์ที่ใช้ในการทดสอบ มีทั้งสิ้น 1 สายพันธุ์ คือ

- 1) *Candida albicans* (1 isolate: clinical isolate)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมสายพันธุ์ mutant

นำเชื้อ *Lactobacillus* ที่ต้องการทดสอบมา culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony มาเจือจางใน steriled 0.85% NaCl นำไปวัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard นำสารละลายเซลล์ปริมาณ 10 µl ใส่ลงเพลท sterile และวางไว้ใต้หัวฉีดพลาสติกมา ระยะห่างระหว่างตัวอย่างกับหัวฉีดพลาสติกมากที่สุด 2 มม., และพ่นน้ำเข้าประมาณ 4 วินาที อัตราการไหลของก๊าซอาร์กอนคือ 10 ลิตรต่อนาที (SLPM), และเวลาในการ expose ระหว่าง 0 ถึง 150 วินาที หลังจากการ expose ด้วย ARTP แล้ว นำตัวอย่างเชื้อมาเติม steriled 0.85% NaCl ให้มีปริมาณ 100 µl แล้วนำไป spread บน MRS Agar เพื่อบันทึกจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (Ottenheim *et. al.*, 2018) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, และอัตราการตายจะคำนวณตามสูตรดังนี้:

$$\text{Lethality rate} = [1 - (\text{NT}/\text{NU})] \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ NT และ NU คือ จำนวนโคโลนีในกลุ่มที่ expose และกลุ่มที่ไม่ได้ expose ตามลำดับ (Liu *et. al.*, 2020)

3.5.2 การทดสอบเสถียรภาพของการเจริญเติบโตและคุณสมบัติของสารประกอบที่มีฤทธิ์

ทางชีวภาพ (Growth Curve and Production kinetics of Bioactive Substances)

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant มา culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming units per milliliter (CFU / ml)) (Mcfarland, 1907) นำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาณ 500 μ l ปิ่เปิดลงในอาหาร MRS Broth 5 มล. (1%) ของอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 150 rpm เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ ทำโดยการนำตัวอย่างอาหารเหลวไปวัดค่าการดูดกลืนแสง(OD) ที่ 600 นาโนเมตร (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) และนำค่าที่ได้ไปทำกราฟแสดงการเจริญเติบโต จากนั้นนำตัวอย่างอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ตัวอย่าง cell-free supernatant (CFS) ที่ได้จะนำไปทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สนใจและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

3.5.3 การตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วย Agar well diffusion

เทคนิค agar well diffusion คัดแปลงจาก EUCAST. 2022 โดยการนำเชื้อที่ต้องการทดสอบมา culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar/ PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming units per milliliter (CFU / ml) bacteria ; 1.5×10^6 colony forming units per milliliter (CFU / ml); yeast) (Mcfarland, 1907) นำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วมา streak ด้วยวิธี three way swab ลงใน plate Muller Hilton agar (MHA) จากนั้นทำการเจาะรู agar ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ด้วย sterile cork borer ใช้ autopipette ปิ่เปิดตัวอย่าง cell-free supernatant ชนิดต่าง ๆ ที่สนใจ ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันไป (25, 50, 100 % v/v) ใส่ลงไปในหลุมที่เจาะเตรียมไว้ปริมาณ 30 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นวัด inhibition zone ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ gentamycin/clotrimazole (1 mg/ml) และ negative control คือ sterile media Muller Hilton broth แล้วเลือกเชื้อที่ให้ inhibition zone ขนาดที่สนใจ นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.5.4 การตรวจสอบความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบด้วยเทคนิค

Microdilution

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เก็บไว้ใน freezing vial ออกมาทำการ culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar/PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming units per milliliter (CFU / ml) bacteria ; 1.5×10^6 colony forming units per milliliter (CFU / ml); yeast) (Mcfarland, 1907) นำเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้วมาเจือจางในอัตราส่วน 1 : 100 ใน MHB/RPMI เพื่อให้มีปริมาณเชื้อประมาณ $10^6 / 10^3$ CFU/ml

หมายเหตุ : ควรทำการปรับความขุ่นของเชื้อแบคทีเรีย ก่อนทำการทดสอบความไวของยาต่อต้านจุลินทรีย์ไม่เกิน 15 นาที

นำ cell-free supernatant ที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจจากการทดสอบ Agar well diffusion มาทำการเจือจางด้วยอาหารเหลว Muller Hilton broth ปราศจากเชื้อ โดยวิธี two-fold dilution ใน sterile microtiter plate และเตรียม Negative control เป็น control อาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อตรวจสอบ sterility ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียม Growth control ของเชื้อ โดยไม่เติมสาร cell-free supernatant เพื่อตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อ จากนั้นเติม inoculum ของเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจใส่ลงในหลุมเป็นหลุมทดสอบและหลุม Growth control หลุมละ 50 µl และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ปริมาตรเท่ากับหลุมทดสอบ ปิดฝา microtiter plate จากนั้นนำไป incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การแปลผล

เมื่อหยด resazurin indicator (0.18%) 10 µl แล้ว incubate 1 ชั่วโมง สังเกตสีที่เกิดขึ้น ถ้าให้ผลเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วง แสดงว่าผลเป็นบวกคือสามารถยับยั้งได้ และถ้าให้ผลเป็นสีชมพูหรือไม่มีสี แสดงว่าให้ผลเป็นลบคือไม่สามารถยับยั้งได้ ดูผลและบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จากนั้นนำผลที่เป็นบวกจากการทดสอบ MIC ไปทดสอบ MBC ต่อไป โดยชุดควบคุมทดสอบใช้ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 80 µg/ml ทำการทดสอบที่เหมือนกันอีก 3 ครั้ง

3.5.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Bactericidal Concentration; MBC)

หาค่า MBC ด้วยวิธี Streak Plate Method (ดัดแปลงจาก CLSI, 2018) จุ่มเชื้อจากหลุมที่ให้ผลบวกจากค่า MIC มา streak บน Tryptone Soya Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การอ่านผลค่า MBC ทำได้โดย ถ้าความเข้มข้นของหลุมทดสอบและยาที่สามารถฆ่าเชื้อได้จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

3.5.6 การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay ดัดแปลงตามวิธีการที่ระบุโดย Tan *et al*, 2009 โดยการนำ cell-free supernatant จากแต่ละสายพันธุ์มาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0.78, 1.56, 12.5, 25, 50, 100 % v/v) ปริมาตร 100 μ l ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติมสารละลาย DPPH (0.02 mg/100 ml in MeOH) 100 μ l ลงไป ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (BioTek, USA) เปรียบเทียบกับ Negative control คือ การใช้น้ำกลั่นแทนสารทดสอบ จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH (% Radical scavenging) จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = \frac{\% \text{Radical scavenging}}{A_{\text{control}}} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

ทำ Calibration curve ด้วยวิธี Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) โดยเตรียมสารละลาย L-ascorbic acid ใน Methanol ให้มีความเข้มข้นต่างๆ (7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml) แล้วนำมาทดสอบกับสารละลาย DPPH เช่นเดียวกับ cell free medium คำนวณหาปริมาณจากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน และแสดงค่าในรูปแบบ μ g Vitamin C equivalents ของตัวอย่าง cell free medium

3.5.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content)

โดยนำ cell-free supernatant ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (0.78, 1.56, 12.5, 25, 50, 100 % v/v) ปริมาตร 30 μ l ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติม 1 % Aluminum trichloride solution concentration (w/v) 170 μ l ลงไปผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทำการ incubate 30 °C เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (BioTek, USA) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ Quercetin ในความเข้มข้นต่างๆ (1, 10, 100, 500 μ g/ml) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณจากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน Quercetin (calibration curve)

การทดสอบคุณสมบัติ probiotic ด้านอื่นๆ

3.5.8 การศึกษาความไวต่อยา (Drug Susceptibility Study)

ความไวต่อยาของแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ต่อยาปฏิชีวนะที่สนใจโดยใช้วิธี disk diffusion method (Bauer et. al., 1966) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant จะถูกนำมา culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ pure culture จากนั้นนำ isolated colony ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมา suspend ใน 0.85% NaCl วัด absorbance ให้ได้ 0.5 McFarland Standard (ปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming units per milliliter (CFU / ml)) (Mcfarland, 1907) นำเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วมา streak ด้วยวิธี three way swab ลงใน plate Muller Hilton agar (MHA) นำแผ่นดิสก์ยา; cefoxitin (30 ไมโครกรัม), ceftriaxone (30 ไมโครกรัม), ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), doxycycline (30 ไมโครกรัม), erythromycin (15 ไมโครกรัม), gentamycin (10 ไมโครกรัม), imipenem (10 ไมโครกรัม), และ vancomycin (30 ไมโครกรัม) (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) วางบนผิวของ MH agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัด inhibition zone และรวบรวมผลการทดสอบนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

3.5.9 Strain Stability

การทดสอบ Strain Stability ของแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ในการผลิตกิจกรรมที่ต่อเนื่องของคุณสมบัติการต้านจุลชีพชนิดต่างๆ และคุณสมบัติสร้างสาร anti-oxidant ทำได้โดยการ reculture แบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มใน MRS Agar เป็นเวลา 15 generations (Wang et. al., 2010) เก็บตัวอย่างเชื้อแต่ละ generations ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS Agar ปิเปตเชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 500 μ l ปิเปตลงในอาหาร MRS Broth 49.50 มล. (1%) ของอาหารนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างอาหารเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) ตัวอย่าง cell-free supernatant (CFS) ที่ได้จะนำไปทดสอบเพื่อหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สนใจและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเปรียบเทียบกับ generations แรกต่อไป

3.6 การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษา cell-free supernatant ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ทั้งการทดสอบ Agar well diffusion, MIC และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งคำนวณจากการทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation ; SD)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบการเตรียม *Lactobacillus* สายพันธุ์ mutant

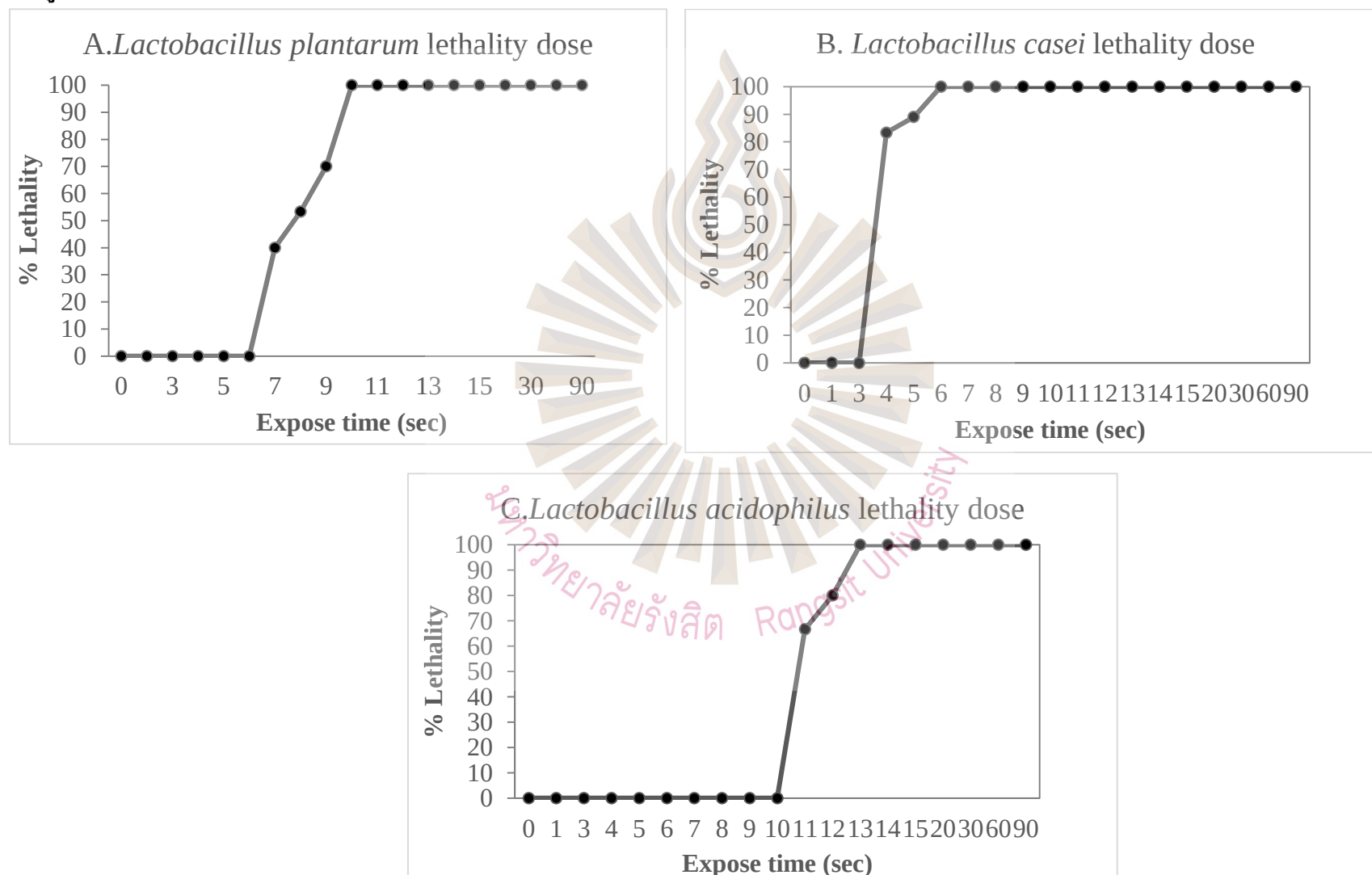
ผลการทดสอบพลาสมาอุณหภูมิห้อง (Atmospheric Room-Temperature Plasma, ARTP) ต่อการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus acidophilus* มีช่วงเวลาที่แตกต่างกันไป โดยพบว่าการสัมผัสกับ ARTP มีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ *L. plantarum* แสดงความทนทานต่อ ARTP ในช่วงเวลา 1-6 วินาทีโดยอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปในช่วงแรก ที่เวลา 7 วินาทีอัตราการตายอยู่ที่ประมาณ 40% และเพิ่มขึ้นเป็น 100% ที่เวลา 10 วินาที (รูปที่ 1A) ในขณะที่ *L. casei* แสดงความไวต่อ ARTP มากที่สุดในกลุ่มที่ทดสอบ โดยอัตราการตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการสัมผัส ที่เวลา 4 วินาที อัตราการตายสูงถึงประมาณ 83.33% และเพิ่มขึ้นเป็น 100% ที่เวลา 6 วินาที (รูปที่ 1B) *L. acidophilus* แสดงความทนทานต่อ ARTP มากที่สุดในกลุ่มที่ทดสอบ โดยอัตราการตายเพิ่มขึ้นช้าที่สุด ที่เวลา 11 วินาที อัตราการตายอยู่ที่ประมาณ 66.67% และเพิ่มขึ้นเป็น 100% ที่เวลา 13 วินาที (รูปที่ 1C) จากผลการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์คือช่วงเวลาที่ทำให้เกิดอัตราการตายประมาณ 40-90% ซึ่งเป็นช่วงที่มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์สูงโดยที่ยังมีเซลล์รอดชีวิตเพียงพอสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ โดยสามารถระบุช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับแต่ละสายพันธุ์ได้ดังนี้:

L. plantarum: 7-9 วินาที

L. casei: 4-5 วินาที

L. acidophilus: 11-12 วินาที

รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบระหว่างอัตราการตายและระยะเวลาที่ใช้การ expose ARTP ของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่นำมาทดสอบ



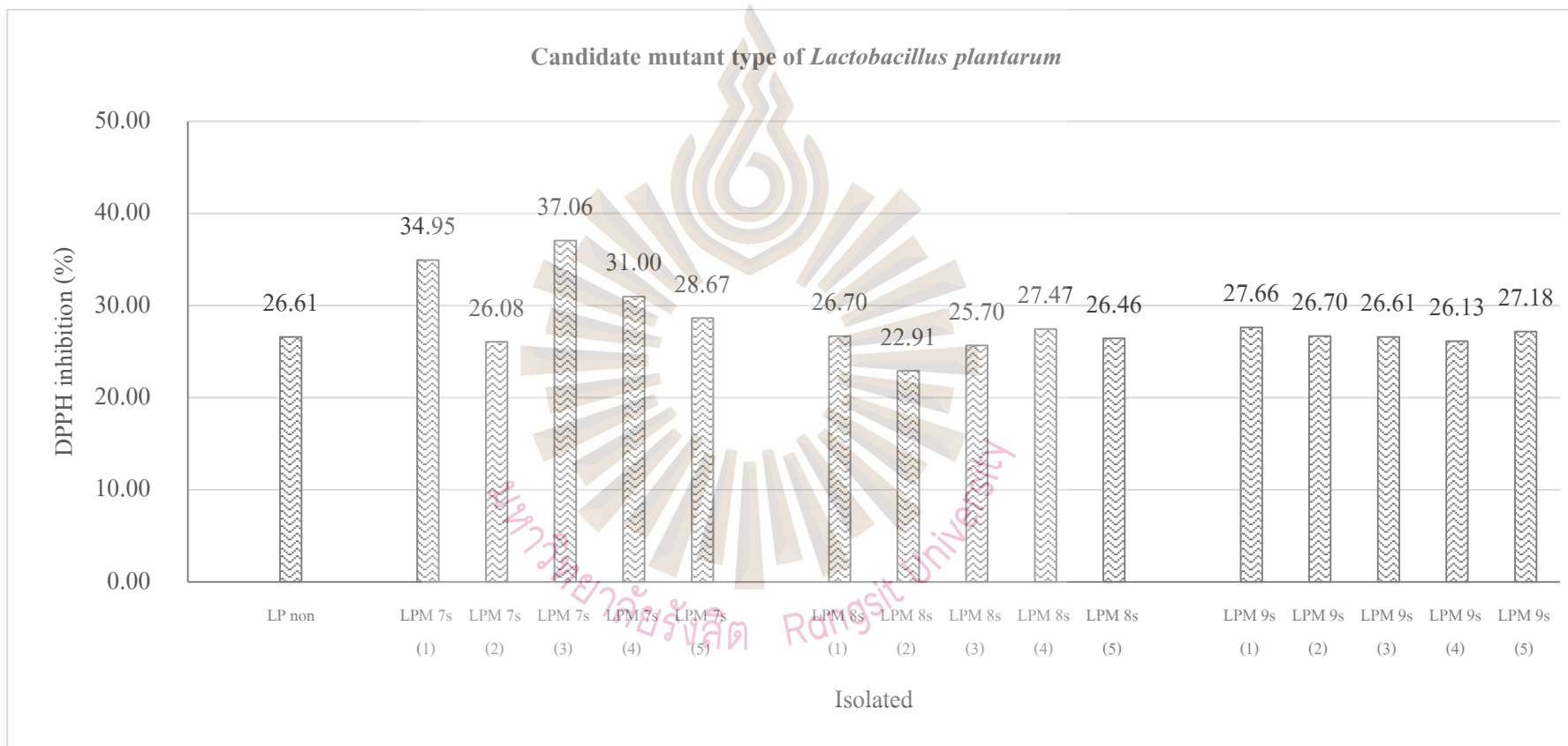
4.2 ผลการทดสอบการคัดเลือก candidates ของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์

การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ (mutant strains) ของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria; LAB) สกุล *Lactobacillus* ที่ผ่านการ expose ด้วยเทคนิค Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียดังกล่าว โดยนำ *Lactobacillus* spp. ที่รอดจากการ expose ด้วย ARTP ในแต่ละครั้งของการ expose ด้วย ARTP เชื้อละ 15 isolated ทั้งสามสายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 24 ชม. แล้วแยก cell-free supernatant จากการเพาะเลี้ยง มาทำทดสอบ DPPH anti-oxidant และเลือก candidate ของแต่ละสายพันธุ์อีกครั้ง โดยเกณฑ์ในการคัดเลือก mutant type ต้องให้ผล DPPH anti-oxidant ที่ดีกว่า wild type ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) อย่างมีนัยสำคัญ

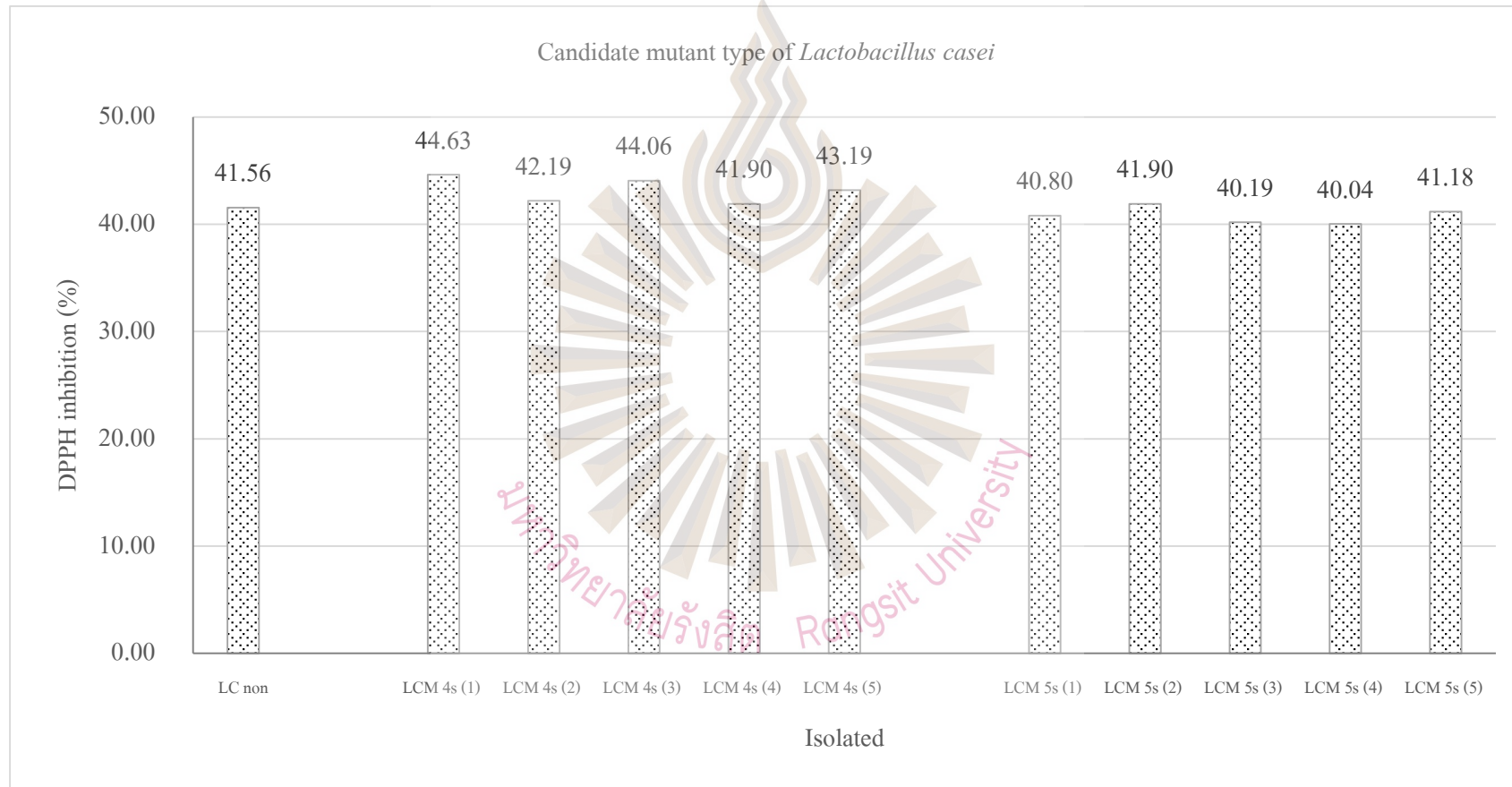
สำหรับ *L. plantarum* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LPM 7s 1(3) แสดงประสิทธิภาพสูงสุดที่ 37.06% เทียบกับสายพันธุ์ wild type ที่ 26.61% ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างโดดเด่นถึง 39.27% ในกรณีของ *L. casei* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ LCM 4s 3(1) แสดงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า DPPH scavenging activity เท่ากับ 44.63% ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ wild type ที่มีค่าเพียง 41.54% คิดเป็นการเพิ่มขึ้นประมาณ 7.44% ในขณะที่ *L. acidophilus* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM 12s 3(2) แสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 49.74% เทียบกับสายพันธุ์ wild type ที่ 31.05% คิดเป็นการเพิ่มขึ้นถึง 60.19% ดังแสดงรูปที่ 4.2, 4.3, 4.4



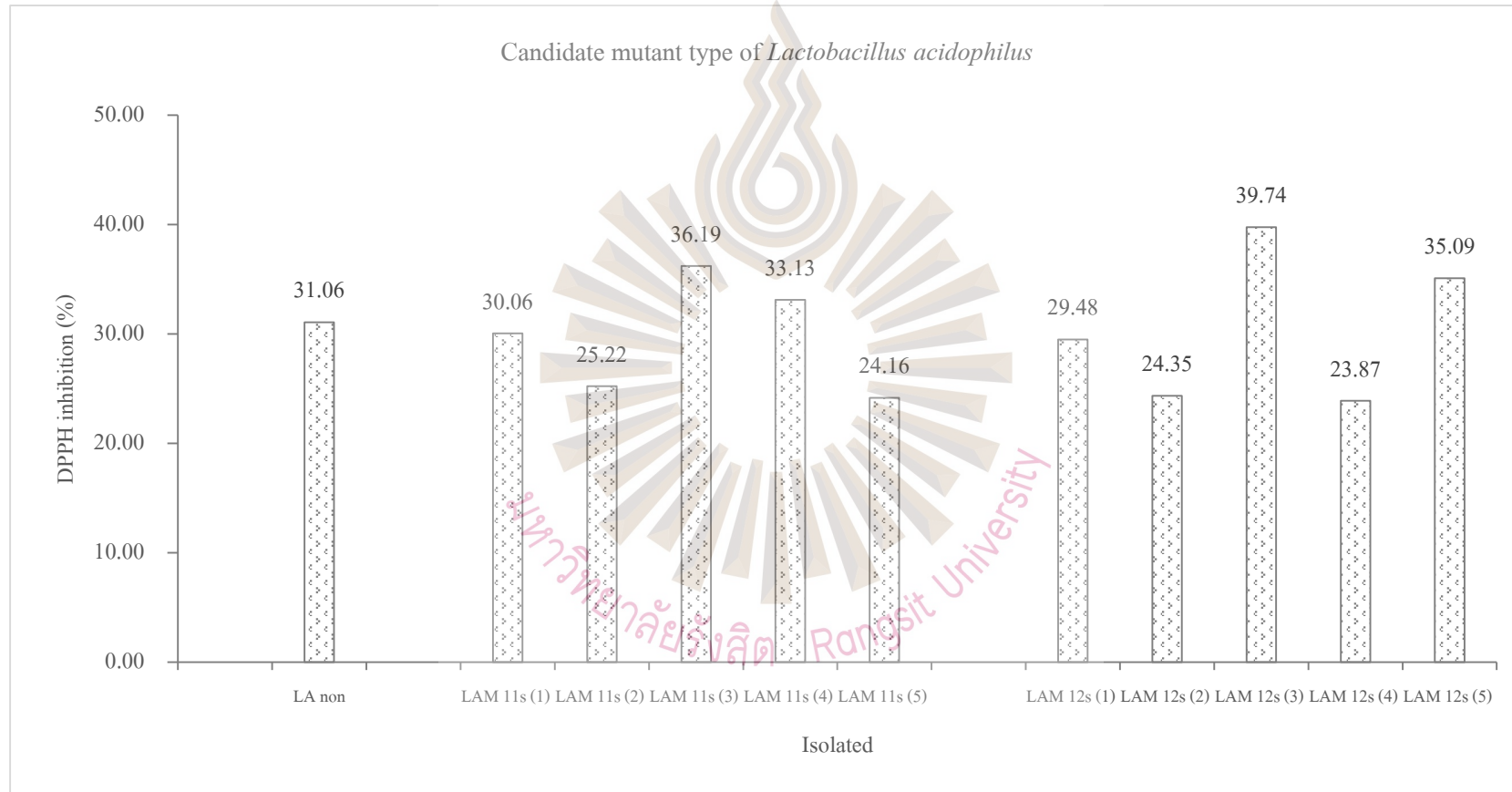
รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ Wild type และ candidates isolated ของ *Lactobacillus plantarum*



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ Wild type และ candidates isolated ของ *Lactobacillus casei*



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ย DPPH ของ Wild type และ candidates isolated ของ *Lactobacillus acidophilus*



อย่างไรก็ตาม เพื่อง่ายต่อการอธิบายการทดสอบต่าง ๆ จึงขอกำหนดชื่อ Isolated ให้สอดคล้องกับ isolated ที่คัดเลือกมาทำการทดสอบดังต่อไปนี้

ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LP non, LPM 7s 1(1) เป็น LPM 1, LPM 7s 1(3) เป็น LPM 2, LPM 7s 1(4) เป็น LPM 3

ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus casei* : LC non, LCM 4s 3(1) เป็น LCM 1, LCM 4s 3(3) เป็น LCM 2, LCM 4s 3(5) เป็น LCM 3

ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*: LA non, LAM 11s 3(1) เป็น LAM 1, LAM 12S 3(3) เป็น LAM 2 , LAM 12s 5(3) เป็น LAM 3

4.3 การทดสอบเสถียรภาพของการเจริญเติบโต

การทดสอบเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*; LP, *Lactobacillus casei*; LC และ *Lactobacillus acidophilus*; LA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD620) ที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง และเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant strains) จำนวนสามสายพันธุ์ย่อย (M1, M2, M3) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงรูปแบบการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงกันในทุกสายพันธุ์ โดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และมีอัตราการเจริญเติบโตที่ชะลอตัวลงในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นลักษณะการเจริญเติบโตที่พบนี้สอดคล้องกับทฤษฎีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แบบ sigmoid curve ซึ่งประกอบด้วยระยะ lag phase, logarithmic phase, stationary phase และ death phase โดยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แบคทีเรียอยู่ในช่วง logarithmic phase ที่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และในช่วง 24-48 ชั่วโมง อาจเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่มีอัตราการเจริญเติบโตชะลอตัวลง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ดั้งเดิมของเชื้อ *L. plantarum* กับสายพันธุ์กลายพันธุ์พบว่า LPM2 และ LPM3 ที่ 0 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตที่เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่ LPM1 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเล็กน้อย ที่ 24 ชั่วโมง สายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้ง 3 ตัว มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าส่วนที่ 48 ชั่วโมง LPM 1 และ LPM 3 มีการเจริญเติบโตที่เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมแต่ LPM2 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 4.5)

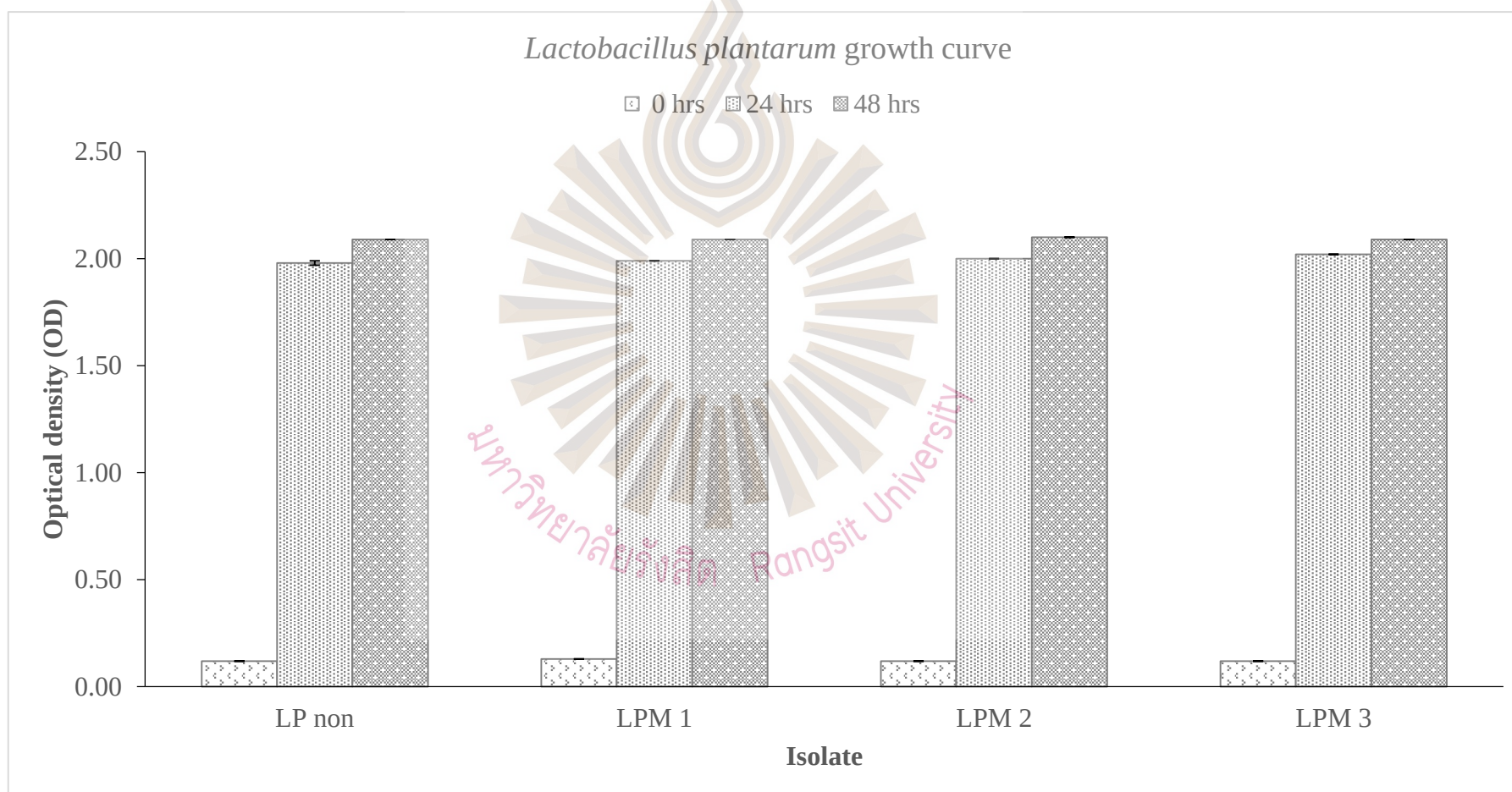
ในขณะที่ *L. casei* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LCM1 และ LCM3 มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าเล็กน้อย LCM2 มีการเจริญเติบโตที่เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่ 24 ชั่วโมง LCM2 และ LCM3 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อย แต่ LCM1 มีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าเล็กน้อยส่วนที่ 48 ชั่วโมง สายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้ง 3 ตัว มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า (รูปที่ 4.6)

สำหรับผลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* พบว่า สายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM1, LAM2 และ LAM3 ที่ 0 ชั่วโมง แสดงการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าเล็กน้อยต่อสายพันธุ์ดั้งเดิม ที่

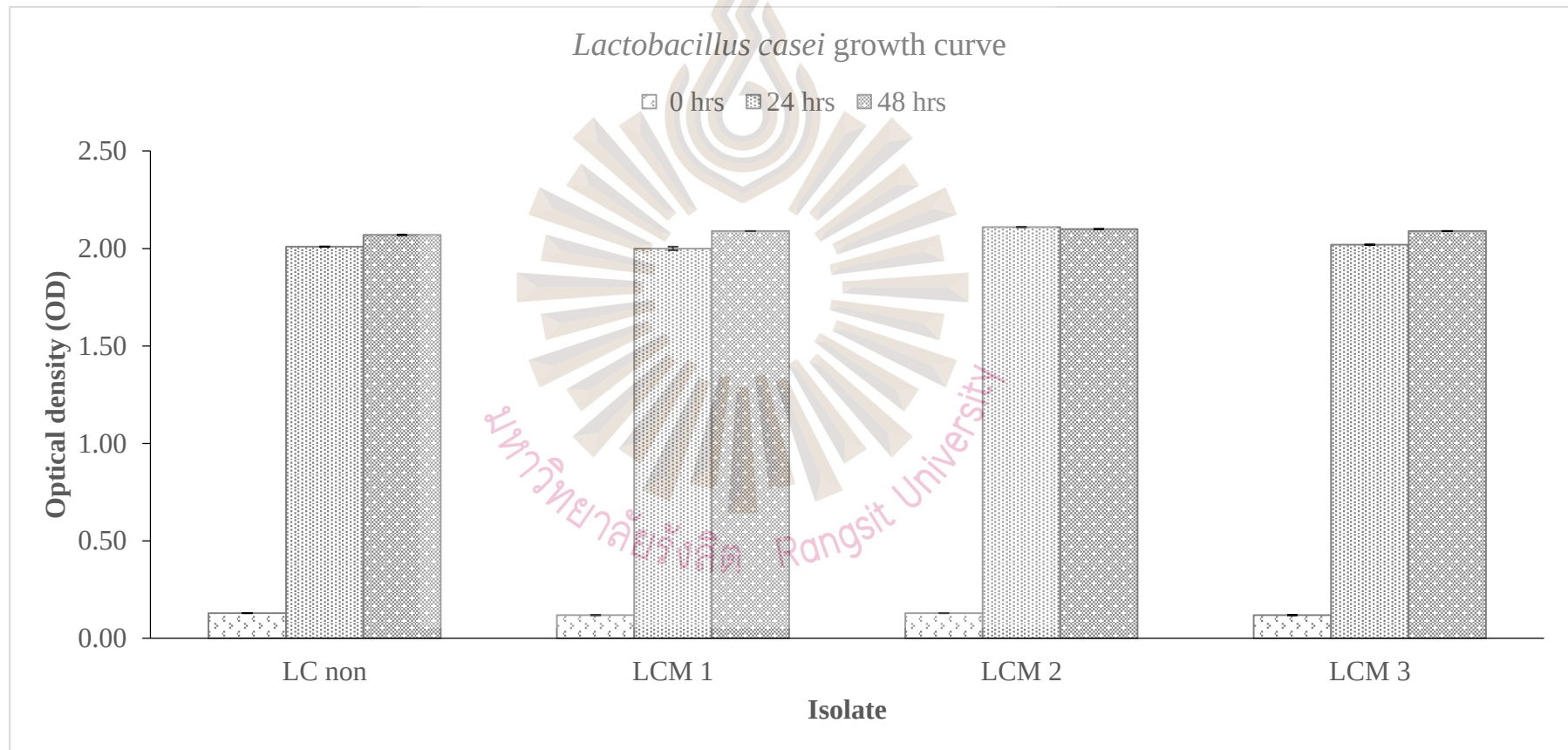
24 ชั่วโมง LAM1, LAM2 และ LAM3 แสดงการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วนที่ 48 ชั่วโมง LAM2 และ LAM 3 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเล็กน้อยต่อสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่ LAM 1 มีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าเล็กน้อย (รูปที่ 4.7)



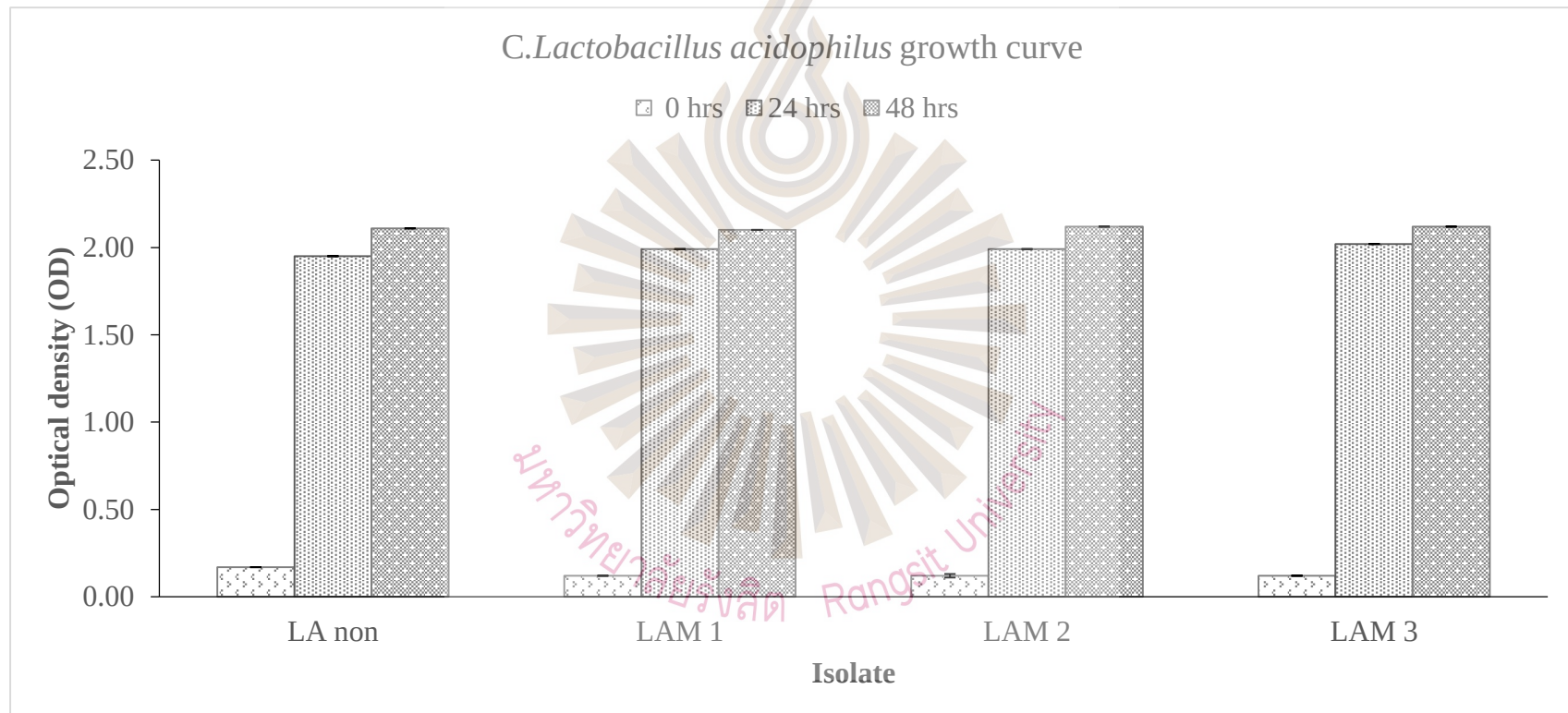
รูปที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant strains) ของ *Lactobacillus plantarum* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant strains) ของ *Lactobacillus casei* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant strains) ของ *Lactobacillus acidophilus* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



4.4 ผลการตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของ cell-free supernatant ด้วย Agar well diffusion

การประเมินประสิทธิภาพของ cell-free supernatant ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ซึ่งผ่านการปรับปรุงคุณสมบัติด้วยเทคนิคพลาสมาอุณหภูมิห้อง (Room-Temperature Plasma; ARTP) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ โดยใช้วิธี Agar well diffusion โดยมี ยา Amikacin/ clotrimazole ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น positive control ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *Lactobacillus* spp. หลังจากการ exposed ARTP ที่ระยะเวลาต่างๆ จากผลการทดสอบในตารางที่ 4.1 พบว่า cell-free supernatant ของเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ Wild type (LP non) ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *E. faecalis*, *S. sonnei* และ *B. subtilis* โดยมีขนาดวงการยับยั้งอยู่ในช่วง 7.00 - 10.33 mm. อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยเฉพาะ LPM2 แสดงให้เห็นถึงวงการยับยั้งที่กว้างขึ้นมาก สายพันธุ์ LPM2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii* และ *S. aureus* MRSA ซึ่งสายพันธุ์ต้นแบบไม่สามารถยับยั้งได้ โดยมีขนาดวงการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* MRSA สูงถึง 10.0 ± 1.0 mm. ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย ARTP ในการรักษาการติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีเชื้อ MRSA และ *A. baumannii* เป็นสาเหตุ

ตารางที่ 4.2 พบว่า cell-free supernatant ของเชื้อ *L. casei* สายพันธุ์ Wild type (LC non) ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. Typhi*, *S. sonnei*, *A. baumannii*, *S. aureus* MRSA และ *B. subtilis* โดยมีขนาด inhibition zone อยู่ในช่วง 6.7 ± 0.6 ถึง 10.0 ± 1.0 mm. ในขณะที่สายพันธุ์ Mutant (LCM1, LCM2, LCM3) แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยเฉพาะ LCM1 และ LCM2 แสดงขนาด inhibition zone ที่กว้างขึ้นต่อเชื้อ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ซึ่งเป็นเชื้อที่สำคัญของการติดเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายชนิด

จากตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่า cell-free supernatant ของเชื้อ *L. acidophilus* สายพันธุ์ Wild type (LA non) ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *E. faecalis*, *S. Typhi*, *S. sonnei*, *S. aureus* MRSA และ *B. subtilis* โดยมีขนาด inhibition zone อยู่ในช่วง 8.3 ± 0.6 ถึง 10.7 ± 0.6 mm. สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LAM1, LAM2, LAM3) แสดงการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAM3 และ LAM3 ซึ่งให้ผล inhibition zone ที่กว้างขึ้นต่อเชื้อก่อ

โรคทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ รวมถึงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* ในขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งที่ต่ำกว่าหรือไม่มีเลยต่อเชื้อก่อโรคเหล่านี้



ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ *Lactobacillus plantarum* wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบด้วยวิธี Agar Well Diffusion ใน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell free solution	Concentration	Inhibition zone(mm)								
		<i>Escherichia coli</i> ESBL	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
LP non	100	11.0 $\pm$ 0.0	12.3 $\pm$ 0.6	-	8.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	8.7 $\pm$ 1.2	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPM1	100	11.7 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	-	-	-	6.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
LPM2	100	13.0 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 0.6	-	10.7 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	-	-
	50	-	11.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
LPM3	100	11.3 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 0.0	-	7.3 $\pm$ 0.6	-	-
	50	-	11.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	10.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
Amikacin	1 mg/mL	29.3 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 3.2	26.0 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 2.1	24.7 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	-
Clotrimazole	1 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	25.3 $\pm$ 0.6

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ *Lactobacillus casei* wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion ใน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell free solution	Concentration	Inhibition zone(mm)								
		<i>Escherichia coli</i> ESBL	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
LC non	100	-	-	10.0 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 1.0	9.3 $\pm$ 0.6	-	9.7 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCM1	100	-	-	10.7 $\pm$ 0.6	-	10.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-	8.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	9.0 $\pm$ 1.0	-	-	-	-	-
LCM2	100	-	-	9.7 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 1.7	10.0 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 0.6	-	5.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	9.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCM3	100	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	-	9.3 $\pm$ 0.6	-	9.7 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amikacin	1 mg/mL	29.3 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 3.2	26.0 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 2.1	24.7 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	-
Clotrimazole	1 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	25.3 $\pm$ 0.6

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบ Agar well diffusion จาก cell-free supernatant ของ *Lactobacillus acidophilus* wild type เปรียบเทียบกับ mutant type ต่อเชื้อแบคทีเรีย/ยีสต์ก่อโรคทางการแพทย์ที่นำมาทดสอบ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion ใน ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell free solution	Concentration	Inhibition zone(mm)								
		<i>Escherichia coli</i> ESBL	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
LA non	100	10.3 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 0.6	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 1	100	-	-	-	10.3 $\pm$ 1.2	9.0 $\pm$ 1.7	-	-	9.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 2	100	11.0 $\pm$ 1.0	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	11.0 $\pm$ 0.0	-	8.3 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	10.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 3	100	10.0 $\pm$ 2.0	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	11.0 $\pm$ 0.0	-	8.3 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	6.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-
	25	-	7.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
Amikacin	1 mg/mL	29.3 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 3.2	26.0 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 2.1	24.7 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	-
Clotrimazole	1 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	25.3 $\pm$ 0.6

4.5 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ cell-free supernatant ด้วยเทคนิค Broth Microdilution

จากผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ของ cell-free supernatant ของเชื้อ *Lactobacillus spp.* ผ่านการปรับปรุงคุณสมบัติด้วยเทคนิคพลาสมาอุณหภูมิห้อง (Room-Temperature Plasma; ARTP) พบว่า cell-free supernatant ของสายพันธุ์ *L. plantarum* WT แสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ที่ 12.5% ต่อเชื้อ *E. coli* ESBL และ 6.25% ต่อ *E. faecalis* VRE ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ LPM 1, LPM 2, และ LPM 3 แสดง MIC และ MBC ที่ปรับตัวสูงขึ้น โดยเฉพาะ LPM 2 ซึ่งแสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *A. baumannii* และ *S. aureus* MRSA ได้ดียิ่งขึ้น โดย MIC อยู่ที่ 25% สำหรับเชื้อทั้งสองชนิด ซึ่งดีกว่าสายพันธุ์ต้นแบบอย่างเห็นได้ชัด

สำหรับสายพันธุ์ *L. casei* สายพันธุ์ต้นแบบ LC non มี MIC ต่อเชื้อ *E. faecalis* VRE ที่ 6.25% และต่อ *P. aeruginosa* MDR ที่ 50% อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ เช่น LCM 1, LCM 2 และ LCM 3 มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LCM 2 ที่มีค่า MIC ที่ 6.25% ต่อ *E. coli* ESBL ซึ่งต่ำกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ

สายพันธุ์ *L. acidophilus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย ARTP ยังแสดงให้เห็นถึงการปรับปรุงในแง่ของประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น LAM 2 แสดงค่า MIC ที่ 12.5% ต่อ *E. faecalis* และ *A. baumannii* ซึ่งเป็นค่าที่ดีกว่าสายพันธุ์ต้นแบบที่แสดง MIC สูงกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.4

[illegible]

4.6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ

จากการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ (mutant type) ที่ผ่านการปรับปรุงด้วยเทคนิค Room-Temperature Plasma (ARTP) พบผลที่น่าสนใจดังนี้

ความไวต่อยา Amikacin: สายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM 1, LAM 2 และ LAM 3 แสดงโซนยับยั้งที่กว้างกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม LA non โดยมีค่าเฉลี่ยโซนยับยั้งอยู่ที่ 34.00, 32.67 และ 30.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่าเฉลี่ยเพียง 25.33 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ด้วย ARTP อาจเพิ่มความไวต่อยา Amikacin ในเชื้อ *Lactobacillus* spp.

ความไวต่อยา Ceftriaxone: สายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM 1 และ LAM 3 แสดงความไวต่อยา Ceftriaxone ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเฉลี่ยโซนยับยั้ง 30.00 และ 27.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่าเฉลี่ยเพียง 10.00 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ LAM 2 กลับไม่แสดงความไวต่อยานี้เลย ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการดื้อยาในเชื้อ

ความไวต่อยา Doxycycline: สายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งสามสายพันธุ์แสดงความไวต่อยา Doxycycline ที่สูงขึ้น โดยเฉพาะ LAM 1 และ LAM 3 ที่มีค่าเฉลี่ยโซนยับยั้ง 22.00 และ 20.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีค่าเฉลี่ย 16.67 มิลลิเมตร

ความไวต่อยา Erythromycin: ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์แสดงความไวต่อยา Erythromycin ในระดับสูง โดยสายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM 1 แสดงผลดีที่สุดด้วยค่าเฉลี่ยโซนยับยั้ง 40.00 มิลลิเมตร

ความไวต่อยา Imipenem: สายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งสามสายพันธุ์แสดงความไวต่อยา Imipenem ที่สูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยมีค่าเฉลี่ยโซนยับยั้งอยู่ระหว่าง 40.00-45.00 มิลลิเมตร

ความไวต่อยา Vancomycin: ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ไม่แสดงความไวต่อยา Vancomycin เลย

จากผลการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ARTP ในการสร้างการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. สามารถเพิ่มความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มยา Amikacin, Ceftriaxone และ Doxycycline ดังแสดงในตารางที่ 4.5, 4.6, 4.7

ตารางที่ 4.5 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus plantarum* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Antibiotics	Inhibition Zone (mm $\pm$ SD)			
	LP non	LPM 1	LPM 2	LPM 3
Amikacin (AK; 30 μ g)	31.33 $\pm$ 1.53	26.67 $\pm$ 1.15	26.00 $\pm$ 2.00	24.67 $\pm$ 1.15
Cefoxitin (FOX; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	15.33 $\pm$ 1.15	0.00 $\pm$ 0.00
Ceftriaxone (CRO; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	21.33 $\pm$ 3.06	24.00 $\pm$ 2.00	17.00 $\pm$ 0.00
Ciprofloxacin (CIP; 5 μ g)	10.67 $\pm$ 1.15	20.67 $\pm$ 1.15	10.67 $\pm$ 0.58	12.67 $\pm$ 1.15
Doxycycline (DO; 30 μ g)	14.33 $\pm$ 0.58	17.00 $\pm$ 1.00	21.33 $\pm$ 1.53	18.00 $\pm$ 0.00
Erythromycin (E; 15 μ g)	38.00 $\pm$ 2.00	40.67 $\pm$ 1.15	42.67 $\pm$ 1.15	37.33 $\pm$ 1.15
Gentamicin (CN; 10 μ g)	32.67 $\pm$ 1.53	38.00 $\pm$ 2.00	32.67 $\pm$ 3.06	32.00 $\pm$ 0.00
Imipenem (IPM; 10 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	47.33 $\pm$ 1.15	42.00 $\pm$ 2.00	46.67 $\pm$ 3.06
Vancomycin (VA; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

ตารางที่ 4.6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus casei* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Antibiotics	Inhibition Zone (mm $\pm$ SD)			
	LC non	LCM 1	LCM 2	LCM 3
Amikacin (AK; 30 μ g)	10.33 $\pm$ 0.58	14.67 $\pm$ 0.58	15.33 $\pm$ 0.58	13.67 $\pm$ 1.53
Cefoxitin (FOX; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ceftriaxone (CRO; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	15.33 $\pm$ 0.58	0.00 $\pm$ 0.00
Ciprofloxacin (CIP; 5 μ g)	15.00 $\pm$ 1.00	19.33 $\pm$ 1.15	12.33 $\pm$ 0.58	20.67 $\pm$ 1.15
Doxycycline (DO; 30 μ g)	15.67 $\pm$ 0.58	25.67 $\pm$ 3.06	16.00 $\pm$ 1.00	22.67 $\pm$ 1.15
Erythromycin (E; 15 μ g)	34.67 $\pm$ 1.53	39.33 $\pm$ 1.15	38.00 $\pm$ 2.00	40.00 $\pm$ 0.00
Gentamicin (CN; 10 μ g)	33.67 $\pm$ 1.15	16.67 $\pm$ 1.15	35.67 $\pm$ 0.58	14.00 $\pm$ 1.73
Imipenem (IPM; 10 μ g)	13.33 $\pm$ 1.15	34.00 $\pm$ 1.00	36.00 $\pm$ 2.00	36.33 $\pm$ 1.53
Vancomycin (VA; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

ตารางที่ 4.7 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Lactobacillus acidophilus* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Antibiotics	Inhibition Zone (mm $\pm$ SD)			
	LA non	LAM 1	LAM 2	LAM 3
Amikacin (AK; 30 μ g)	25.33 $\pm$ 1.15	34.00 $\pm$ 0.00	32.67 $\pm$ 0.58	30.00 $\pm$ 0.00
Cefoxitin (FOX; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Ceftriaxone (CRO; 30 μ g)	10.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	27.00 $\pm$ 0.00
Ciprofloxacin (CIP; 5 μ g)	17.33 $\pm$ 1.15	16.00 $\pm$ 0.00	15.00 $\pm$ 0.00	18.00 $\pm$ 0.00
Doxycycline (DO; 30 μ g)	16.67 $\pm$ 0.58	22.00 $\pm$ 0.00	16.33 $\pm$ 0.58	20.00 $\pm$ 0.00
Erythromycin (E; 15 μ g)	32.00 $\pm$ 2.00	40.00 $\pm$ 0.00	35.00 $\pm$ 0.00	32.00 $\pm$ 0.00
Gentamicin (CN; 10 μ g)	38.33 $\pm$ 0.58	30.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00
Imipenem (IPM; 10 μ g)	39.67 $\pm$ 0.58	45.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00
Vancomycin (VA; 30 μ g)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

4.7 ผลการทดสอบการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเทคนิค DPPH inhibition test

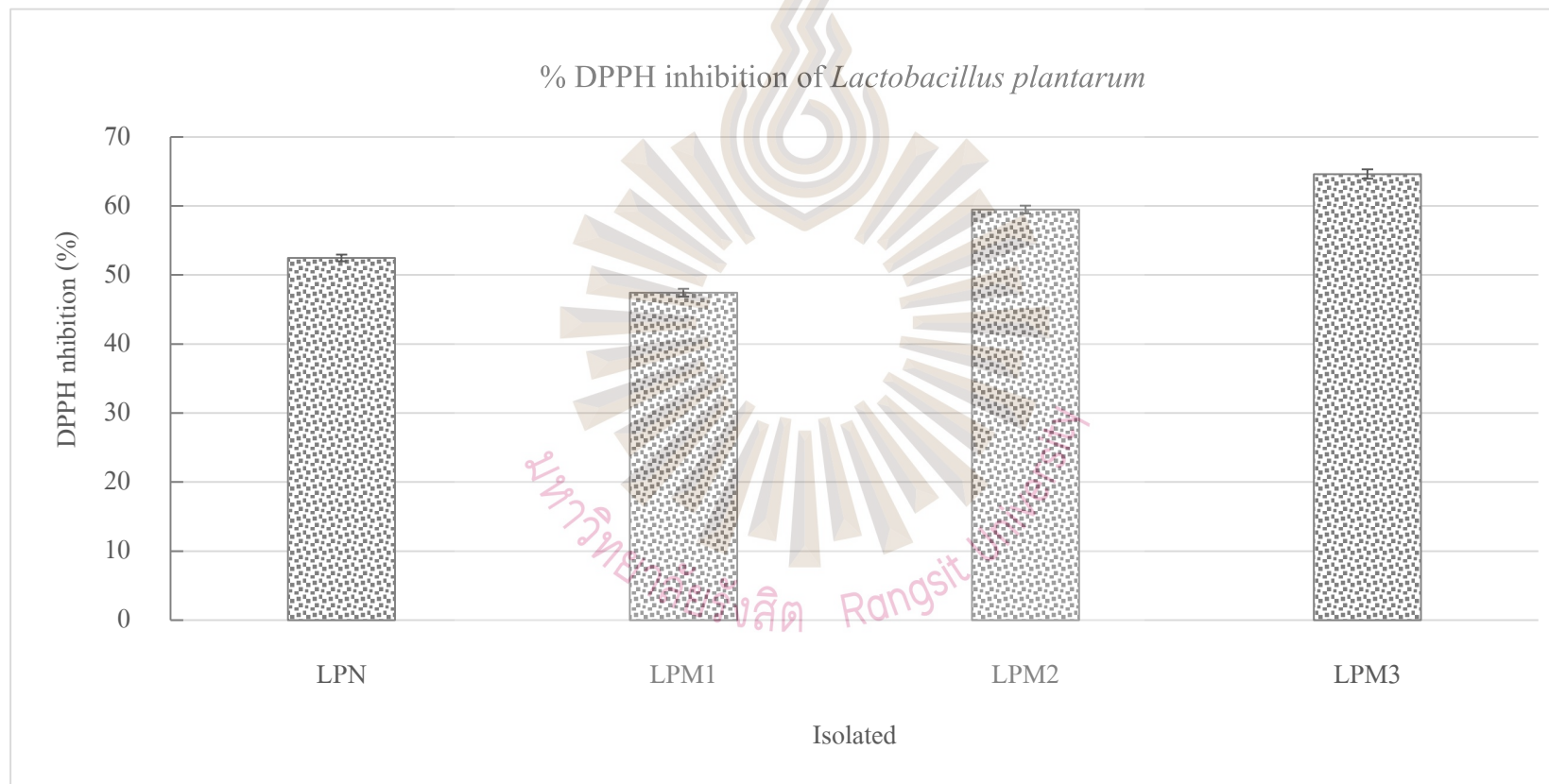
ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน *Lactobacillus* spp. ทั้งสามสายพันธุ์ พบว่า

ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus plantarum*: Wilde type (LPN) มีค่า % DPPH inhibition สูงสุดที่ $52.47 \pm 0.49\%$ พบปริมาณ VCEAC 341.89 ± 3.40 μg Vitamin C equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LPM3) พบมีค่า % DPPH inhibition สูงสุดที่ $64.63 \pm 0.70\%$ (426.05 ± 4.85 μg Vitamin C equivalents) รองลงมาคือ LPM2 ($59.49 \pm 0.58\%$; 390.46 ± 4.01 μg Vitamin C equivalents), LPM1 ($47.43 \pm 0.49\%$; 307.05 ± 3.85 μg Vitamin C equivalents) ตามลำดับ (รูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.8)

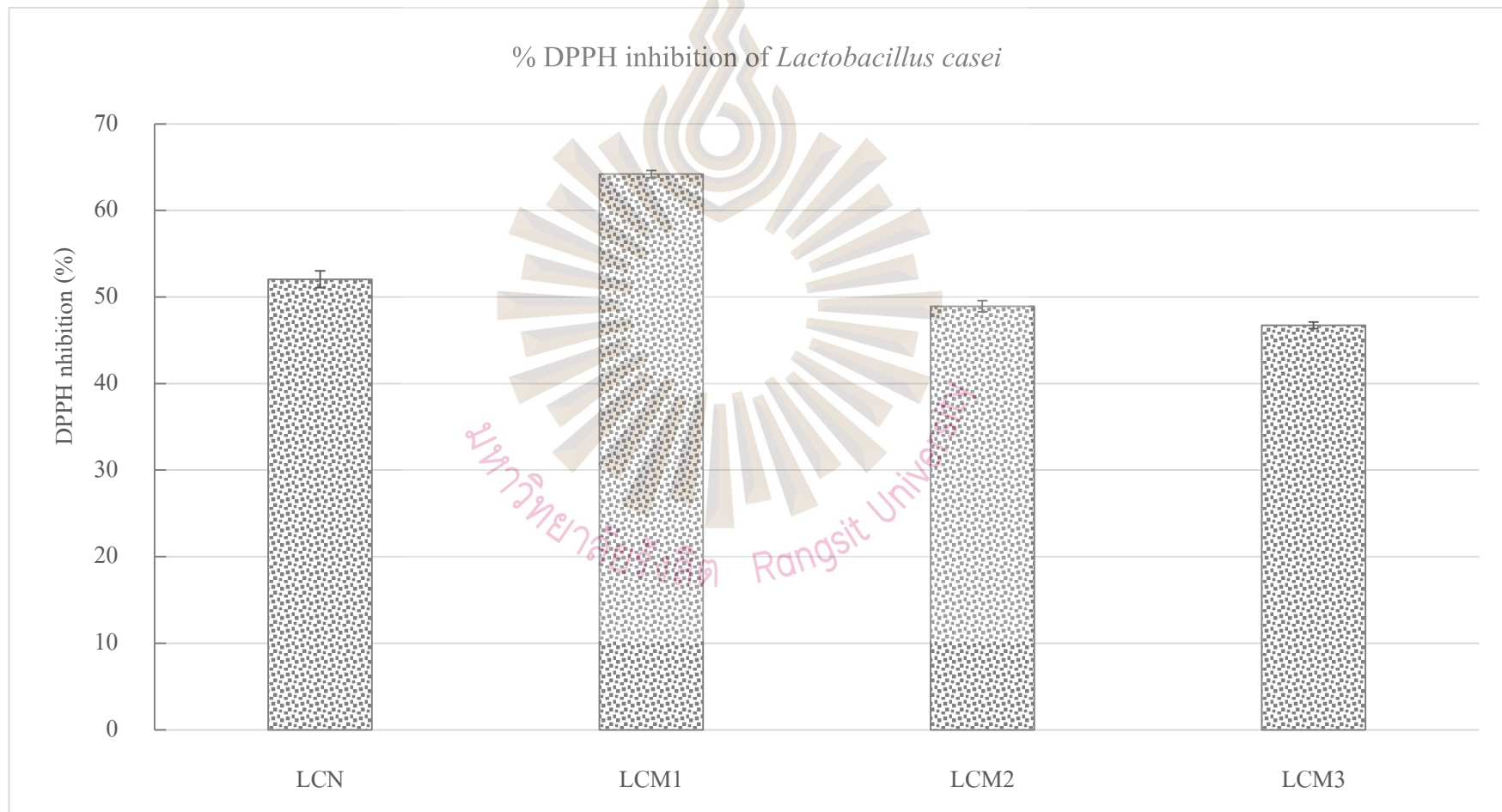
ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus casei*: Wilde type (LCN) มีค่า % DPPH inhibition สูงสุดที่ $52.20 \pm 0.04\%$ และพบปริมาณ VCEAC 338.93 ± 6.70 μg Vitamin C equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LCM1) พบมีค่า % DPPH inhibition สูงสุดที่ 64.20 ± 0.97 (423.08 ± 2.80 μg Vitamin C equivalents) รองลงมาคือ LCM2 ($48.93 \pm 0.65\%$; 317.43 ± 4.49 μg Vitamin C equivalents), LAM3 ($46.73 \pm 0.37\%$; 302.23 ± 2.57 μg Vitamin C equivalents) ตามลำดับ (รูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.10)

ในกลุ่มเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*: Wilde type (LAN) มีค่า % DPPH inhibition สูงสุดที่ $58.63 \pm 0.33\%$ พบปริมาณ VCEAC 384.53 ± 2.23 μg Vitamin C equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LAM1, LAM2, LAM3) พบ % DPPH inhibition ใกล้เคียงกัน คือ $54.23 \pm 0.52\%$; 354.13 ± 3.58 , $52.95 \pm 0.46\%$; 345.23 ± 3.21 และ $53.97 \pm 0.52\%$; 352.27 ± 3.58 μg Vitamin C Equivalents ตามลำดับ (รูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.10)

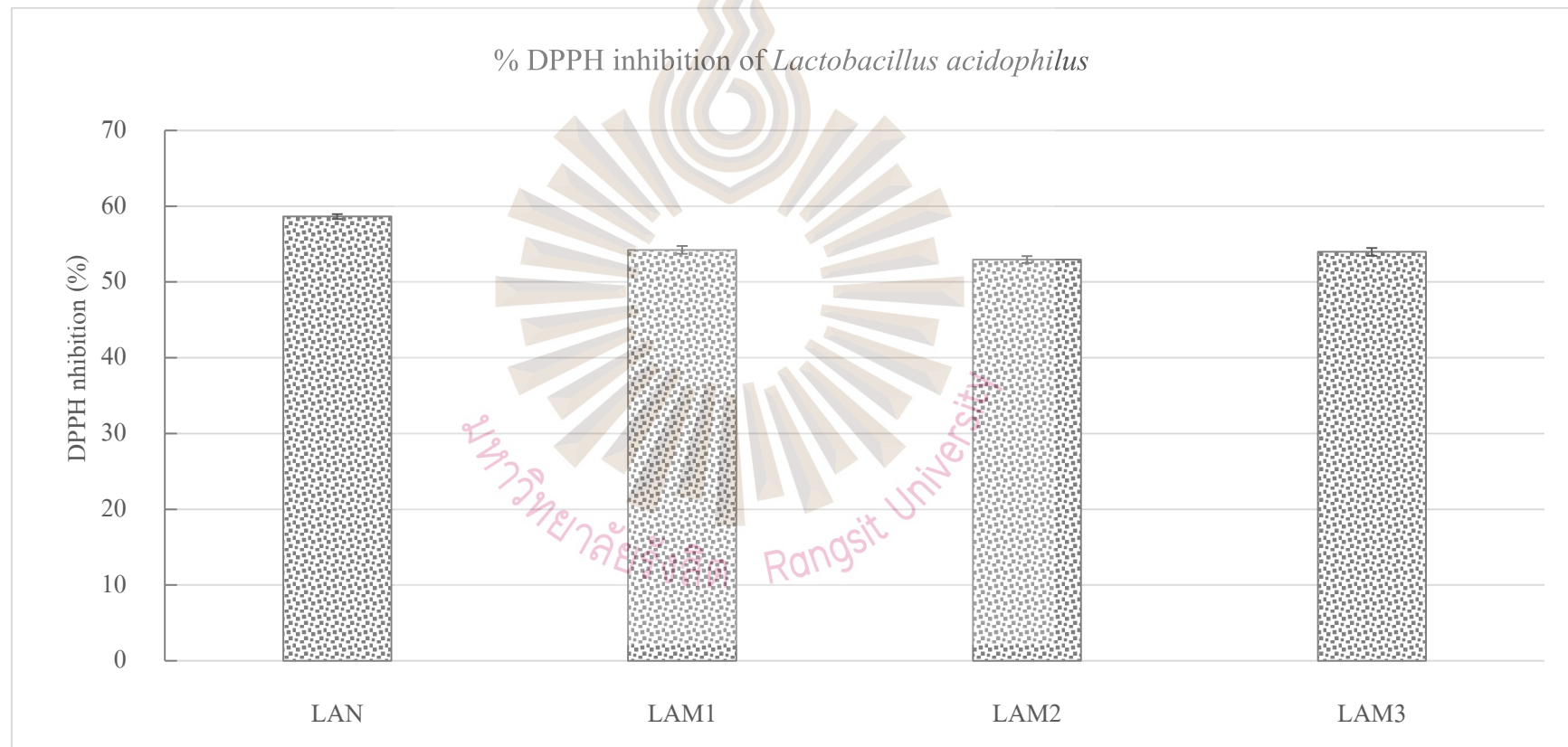
รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.9 ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.10 ผลการทดสอบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ใน *Lactobacillus acidophilus* สายพันธุ์ wild type และ สายพันธุ์ mutant ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



ตารางที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบ DPPH ของ cell-free supernatant ใน *Lactobacillus* spp. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell free solution	Total anti-oxidant (ตg Vitamin C equivalents)
LP non	341.89 $\pm$ 3.40
LPM1	390.46 $\pm$ 4.01
LPM2	307.05 $\pm$ 3.85
LPM3	426.05 $\pm$ 4.85
LC non	338.93 $\pm$ 6.70
LCM1	423.08 $\pm$ 2.80
LCM2	302.23 $\pm$ 2.57
LCM3	317.43 $\pm$ 4.49
LA non	314.53 $\pm$ 2.23
LAM1	354.13 $\pm$ 3.58
LAM2	345.23 $\pm$ 3.21
LAM3	352.27 $\pm$ 3.58

4.8 ผลการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid Content)

ผลการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สร้างขึ้นใน cell-free supernatant ของ *Lactobacillus* spp. mutant type เปรียบเทียบกับ wild type โดยเปรียบเทียบปริมาณกับสารมาตรฐาน Quercetin และแสดงผลในรูป μg Quercetin equivalents (Table 4.9) พบว่า

ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum*: Wilde type (LPN) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 32.45 ± 0.10 μg Quercetin equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LPM1, LPM2, LPM3) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 31.45 ± 0.25 , 32.61 ± 0.10 และ 41.76 ± 1.13 μg Quercetin equivalents ตามลำดับ

ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus casei*: Wilde type (LCN) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 42.76 ± 1.92 μg Quercetin equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LCM1, LCM2, LCM3) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 29.95 ± 0.77 , 39.60 ± 2.45 และ 35.50 ± 0.48 μg Quercetin equivalents ตามลำดับ

ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus*: Wilde type (LAN) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 36.94 ± 0.19 μg Quercetin equivalents ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (LAM1, LAM2, LAM3) มีปริมาณ Total Flavonoid Content 36.33 ± 0.10 , 37.99 ± 0.19 และ 31.06 ± 0.67 μg Quercetin equivalents ตามลำดับ



ตารางที่ 4.9 แสดงผลการทดสอบการวิเคราะห์ Total Flavonoid Content ใน *Lactobacillus* spp. ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell-free supernatant	Total Flavonoid Content (μg Quercetin equivalents)
LP non	32.45 ± 0.10
LPM1	31.45 ± 0.25
LPM2	32.61 ± 0.10
LPM3	41.76 ± 1.13
LC non	32.76 ± 1.92
LCM1	29.95 ± 0.77
LCM2	39.60 ± 2.45
LCM3	35.50 ± 0.48
LA non	36.94 ± 0.19
LAM1	36.33 ± 0.10
LAM2	38.99 ± 0.19
LAM3	31.06 ± 0.67

4.9 ผลการทดสอบการทดสอบ Strain Stability

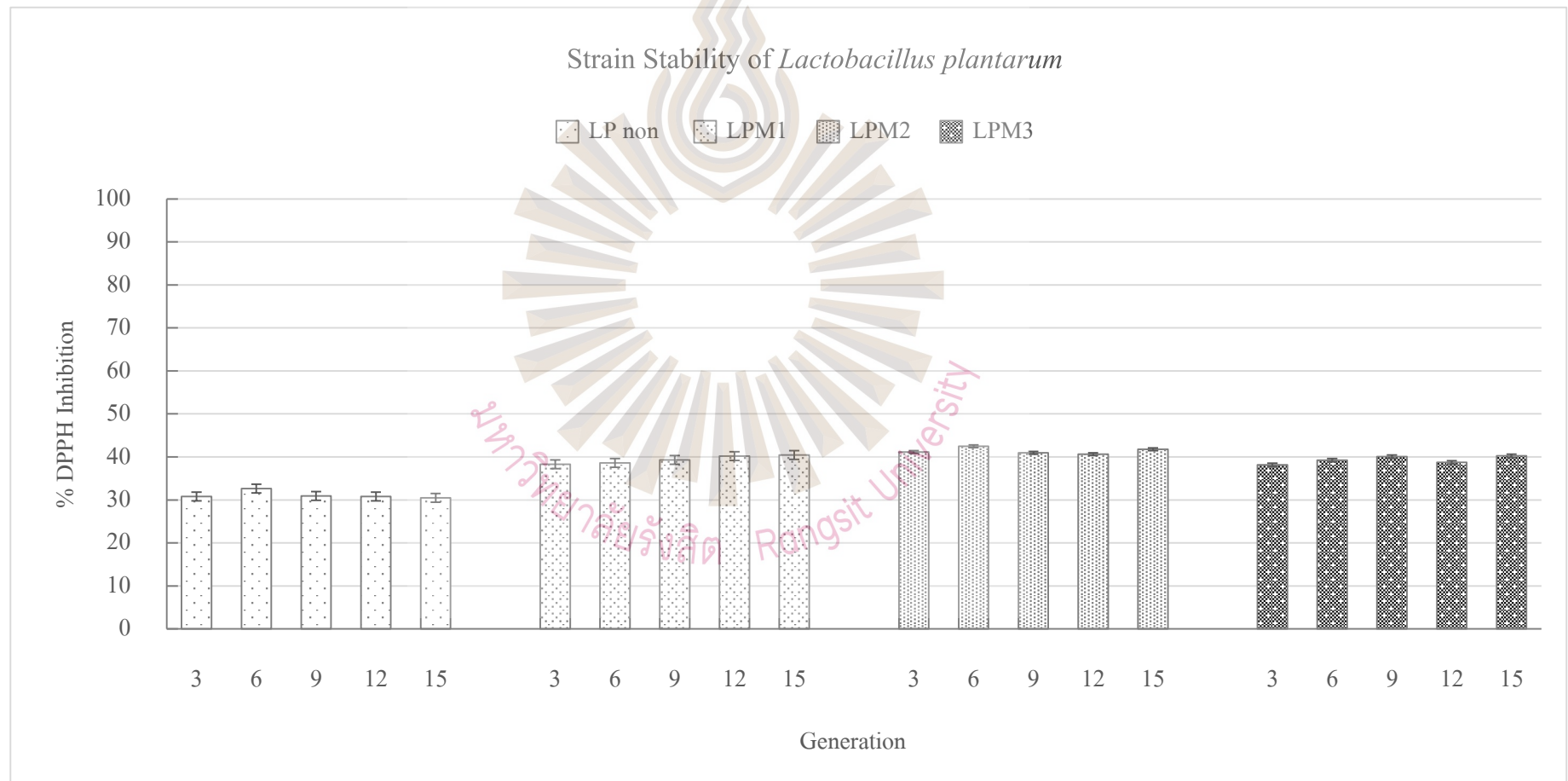
การศึกษานี้การทดสอบ Strain Stability ของแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ในคุณสมบัติการสร้างสาร anti-oxidant ที่ต่อเนื่อง ทำได้โดยการ reculture แบคทีเรียแต่ละ isolated ใน MRS broth และ นำ cell-free supernatant ที่ความเข้มข้น 25% ของ *Lactobacillus* spp. ทั้งสามสายพันธุ์เป็นเวลา 15 generations มาทำการทดสอบ % DPPH inhibition test เพื่อเปรียบเทียบความคงทนในการสร้างสาร anti-oxidant ที่ต่อเนื่อง ผลการทดสอบพบว่า

ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* :Wilde type (LPN) พบมีความเสถียรสูง ค่า % DPPH inhibition อยู่ระหว่าง $30.48 \pm 0.77\%$ ถึง $32.64 \pm 0.11\%$ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ คือ LAM1 และ LAM2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ($38.28 \pm 0.11\%$ ถึง $40.43 \pm 2.36\%$) และ ($40.62 \pm 0.48\%$ ถึง $42.46 \pm 0.48\%$) ตามลำดับ และ LAM3 มีความแปรปรวนเล็กน้อย ($38.15 \pm 0.11\%$ ถึง $40.24 \pm 0.58\%$) แต่โดยรวมเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.11)

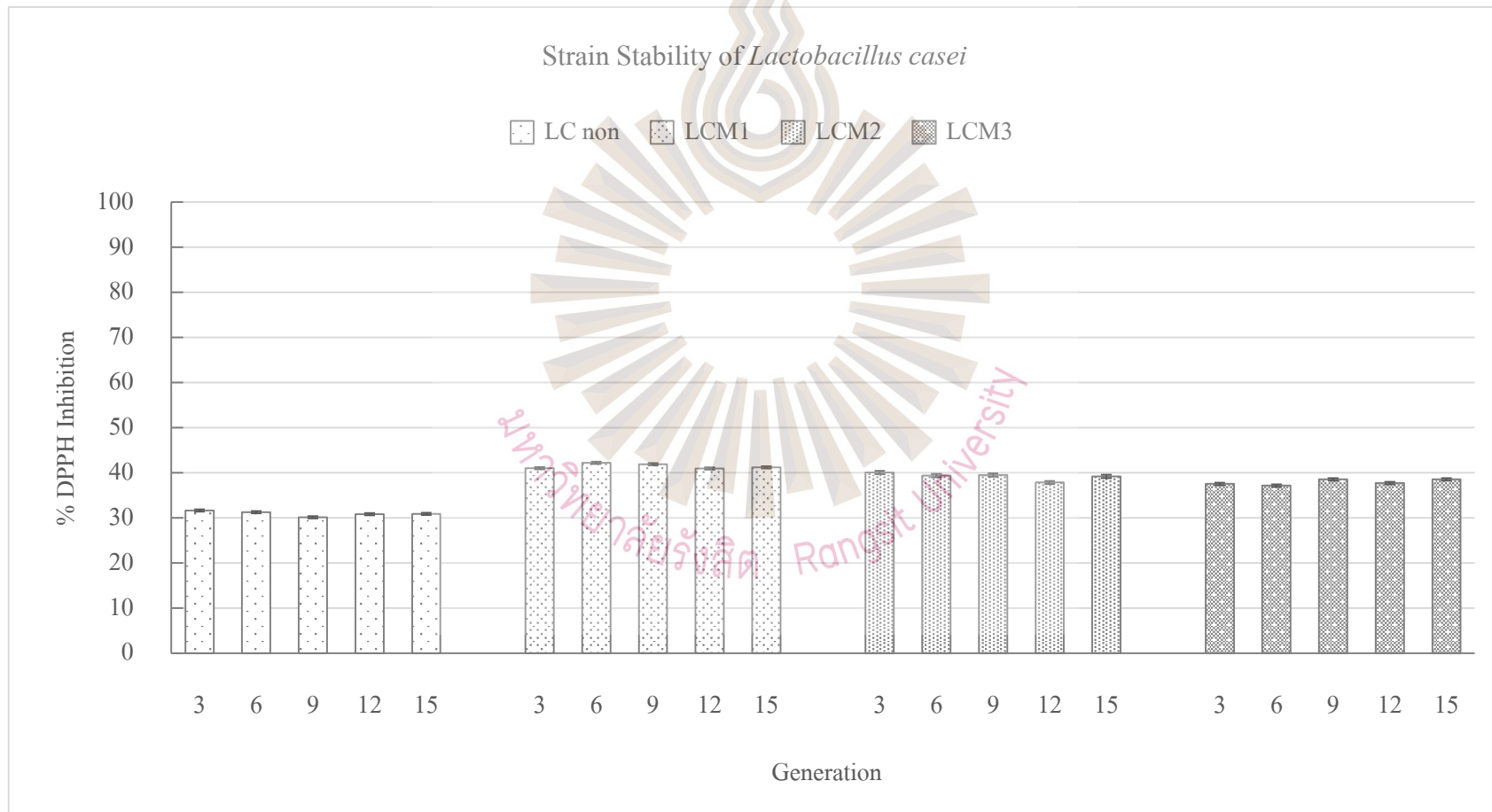
ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus casei*: Wilde type (LCN) พบมีความเสถียรสูง โดยมีค่า % DPPH inhibition อยู่ระหว่าง $30.10 \pm 0.22\%$ ถึง $31.62 \pm 0.11\%$ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ คือ LCM1 แสดงความเสถียรที่ดีและมีค่าสูงสุด ($40.94 \pm 0.22\%$ ถึง $42.21 \pm 1.48\%$) ส่วน LCM2 และ LCM3 มีความเสถียรค่อนข้างดี มีค่า % DPPH inhibition อยู่ระหว่าง $37.83 \pm 0.33\%$ ถึง $40.05 \pm 0.11\%$) และ $37.14 \pm 0.29\%$ ถึง $38.53 \pm 0.40\%$ ตามลำดับ แต่มีค่าต่ำกว่า LCM1 (รูปที่ 4.12)

ในกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus*: Wilde type (LAN) พบมีความแปรปรวนของค่า % DPPH inhibition และแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ($29.28 \pm 0.38\%$ ถึง $32.19 \pm 2.09\%$) ในขณะที่สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ คือ LPM1 และ LPM2 มีแนวโน้มค่า % DPPH inhibition ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ($36.38 \pm 0.61\%$ ถึง $39.61 \pm 0.22\%$) และ ($37.01 \pm 0.61\%$ ถึง $39.73 \pm 0.38\%$) ตามลำดับ และ LPM3 แสดงค่า % DPPH inhibition ที่มีความเสถียรที่ดีและมีค่าสูงสุด($40.49 \pm 0.69\%$ ถึง $43.60 \pm 0.55\%$)(รูปที่ 4.13)

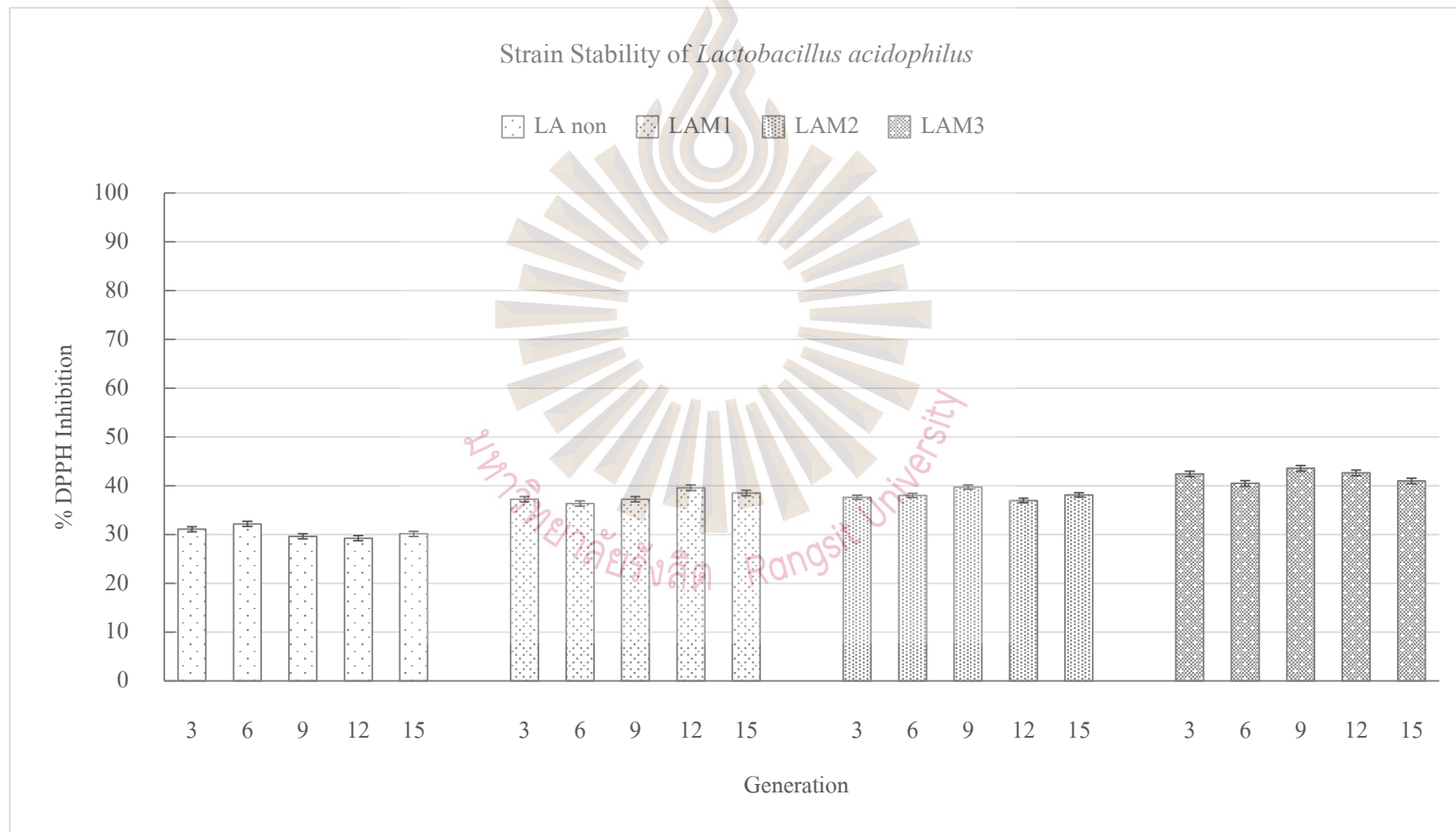
รูปที่ 4.11 ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ของ *Lactobacillus plantarum* เป็นเวลา 15 generations ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.12 ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ของ *Lactobacillus casei* เป็นเวลา 15 generations ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



รูปที่ 4.13 ผลการทดสอบ Strain Stability ของค่า % DPPH inhibition เปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ wild type และสายพันธุ์ mutant ของ *Lactobacillus acidophilus* เป็นเวลา 15 generations ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)



บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเพิ่มขึ้นของเชื้อก่อโรคที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR) ได้เน้นย้ำถึงความจำเป็นในการพัฒนายุทธศาสตร์การรักษาใหม่ๆ โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นที่รู้จักในด้านคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่สามารถใช้เป็นทางเลือกหรือเสริมในการรักษาเชื้อก่อโรคที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ การพัฒนาทางวิศวกรรมพันธุกรรมล่าสุด โดยเฉพาะการใช้เทคโนโลยี Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) ได้เปิดโอกาสให้สามารถเพิ่มคุณสมบัติของจุลินทรีย์ในการต้านจุลชีพได้ดียิ่งขึ้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยเทคโนโลยี ARTP และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบที่ยังไม่ผ่านการคัดแปลง

การทดสอบเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยผลของพลาสมาอุณหภูมิห้อง (Atmospheric Room-Temperature Plasma, ARTP) ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ ผลการทดสอบพบว่า *L. plantarum* มีความทนทานต่อ ARTP ในระดับปานกลาง โดยมีช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์อยู่ที่ 7-9 วินาที ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2019) ที่รายงานว่า *L. plantarum* มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะเครียดได้ดี อันเนื่องมาจากระบบการซ่อมแซม DNA ที่มีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* มีความไวต่อ ARTP มากกว่าที่รายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างในสายพันธุ์ย่อยหรือเงื่อนไขการทดลองที่แตกต่างกัน

L. casei แสดงความไวต่อ ARTP มากที่สุดในกลุ่มที่ทดสอบ โดยมีช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์เพียง 4-5 วินาที ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Zhang *et al.* (2020) ที่รายงานว่า *L. casei* มีความทนทานต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมสูง ความแตกต่างนี้อาจ

เกิดจากกลไกเฉพาะในการตอบสนองต่อ ARTP ที่แตกต่างจากความเครียดรูปแบบอื่น เช่น ความร้อนหรือกรด ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Li *et al.* (2021) ที่พบว่าผลกระทบของ ARTP ต่อจุลินทรีย์อาจแตกต่างจากวิธีการก่อกลายพันธุ์แบบดั้งเดิม

ในทางตรงกันข้าม *L. acidophilus* แสดงความทนทานต่อ ARTP สูงที่สุด โดยมีช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์อยู่ที่ 11-12 วินาที ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen *et al.* (2018) ที่รายงานว่า *L. acidophilus* มีความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดออกซิเดทีฟสูง ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันเซลล์จากผลกระทบของ ARTP อย่างไรก็ตาม ความทนทานที่สูงกว่าที่คาดการณ์นี้อาจเป็นผลมาจากการพัฒนากลไกป้องกันเฉพาะต่อ ARTP ซึ่งยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในระดับโมเลกุล

จากผลการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์คือช่วงเวลาที่ทำให้เกิดอัตราการตายประมาณ 40-90% ซึ่งเป็นช่วงที่มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์สูงโดยที่ยังมีเซลล์รอดชีวิตเพียงพอสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการ (Liu *et al.*, 2018) ความแตกต่างในการตอบสนองต่อ ARTP ของ *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ มีนัยสำคัญต่อการประยุกต์ใช้เทคนิค ARTP ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม ผลการวิจัยนี้ยังชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการปรับเงื่อนไขการทดลอง ARTP ให้เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุดในการสร้างสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ

เมื่อสุ่มเลือก *Lactobacillus spp.* ที่รอดจากการ expose ด้วย ARTP ในแต่ละครั้งของการ expose ด้วย ARTP เชื้อละ 15 isolated ทั้งสามสายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 24 ชม. แล้วแยก cell free solution จากการเพาะเลี้ยง มาทำทดสอบ DPPH anti-oxidant และเลือก candidate ของแต่ละสายพันธุ์อีกครั้ง โดยเกณฑ์ในการคัดเลือก mutant type ต้องให้ผล DPPH anti-oxidant ที่ดีกว่า wild type ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) อย่างมีนัยสำคัญที่ โดย *L. plantarum* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LPM 7s 1(3) แสดงการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระถึง 39.27% เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2018) ที่พบว่า การกลายพันธุ์ด้วย ARTP สามารถเพิ่มการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในจุลินทรีย์ได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นที่

พบในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าที่รายงานไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับปรุงพารามิเตอร์ของ ARTP ให้เหมาะสมกับ *L. plantarum* โดยเฉพาะ

สำหรับ *L. casei* สายพันธุ์กลายพันธุ์ LCM 4s 3(1) แสดงการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 7.44% ซึ่งแม้จะน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น แต่ก็ยังคงมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2020) ที่พบว่า *L. casei* มีความไวต่อการกลายพันธุ์น้อยกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นแม้เพียงเล็กน้อยของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระอาจมีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติอื่น ๆ ของ *L. casei* ที่เป็นที่ต้องการในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

L. acidophilus สายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM 12s 3(2) แสดงการเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดถึง 60.19% ซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่ดีและเกินความคาดหมาย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2019) ที่รายงานการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่น ๆ เพียง 20-30% การเพิ่มขึ้นอย่างมากนี้อาจเป็นผลมาจากความเฉพาะเจาะจงของเทคนิค ARTP ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระใน *L. acidophilus*

ความแตกต่างของผลลัพธ์ระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของ *Lactobacillus* ในการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li *et al.* (2021) ที่พบว่าผลของการกลายพันธุ์ด้วย ARTP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ แม้จะอยู่ในสกุลเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างในโครงสร้างทางพันธุกรรมและกลไกการซ่อมแซม DNA ของแต่ละสายพันธุ์

การเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งสามชนิดนี้มีนัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกและอาหารเสริมสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริบทของการป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดทีฟ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง และโรคทางระบบประสาท (Chen *et al.*, 2017) นอกจากนี้ ผลการวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค ARTP ในการปรับปรุงคุณสมบัติทางชีวภาพของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม

การทดสอบเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant strains) จำนวนสามสายพันธุ์ย่อย (M1, M2, M3) เพื่อวิเคราะห์

เสถียรภาพการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสสามสายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม มีความสำคัญอย่างยิ่งในการพิจารณาความเหมาะสมของสายพันธุ์กลายพันธุ์สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเวชภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้งสามสายพันธุ์ ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์กลายพันธุ์ มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่สอดคล้องกับทฤษฎีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แบบ sigmoid curve ซึ่งประกอบด้วยระยะ lag phase, logarithmic phase, stationary phase และ death phase (Monod, 1949) โดยพบการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งสอดคล้องกับ logarithmic phase และการชะลอตัวของการเจริญเติบโตในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นการเข้าสู่ stationary phase

สำหรับ *L. plantarum* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยเฉพาะ LPM2 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อย โดยเฉพาะในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2019) ที่พบว่าการกลายพันธุ์ด้วย ARTP สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ได้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญเติบโตในการศึกษานี้ค่อนข้างน้อยกว่าที่รายงานไว้ในงานวิจัยดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างในพารามิเตอร์ของ ARTP ที่ใช้หรือความแตกต่างของสายพันธุ์ย่อยของ *L. plantarum* ที่ใช้ในการทดลอง

ในกรณีของ *L. casei* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยเฉพาะ LCM2 และ LCM3 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อยในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง ผลลัพธ์นี้แตกต่างจากการศึกษาของ Li *et al.* (2021) ที่รายงานว่า การกลายพันธุ์ด้วย ARTP ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของ *L. casei* ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากความแตกต่างในสายพันธุ์ย่อยของ *L. casei* ที่ใช้ในการทดลอง หรือการปรับปรุงพารามิเตอร์ของ ARTP ในการศึกษานี้เอง

สำหรับ *L. acidophilus* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ LAM2 และ LAM3 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อยในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ LAM1 มีการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าเล็กน้อยที่ 48 ชั่วโมง ผลลัพธ์นี้สอดคล้องบางส่วนกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2020) ที่

พบว่า การกลายพันธุ์ด้วย ARTP สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* ได้ แต่ผลกระทบอาจแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ย่อยที่เกิดจากการกลายพันธุ์

การที่สายพันธุ์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าหรือเทียบเท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ด้วย ARTP ไม่ส่งผลเสียต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Mota *et al.*, 2018) นอกจากนี้ การที่สายพันธุ์กลายพันธุ์บางสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นอาจส่งผลดีต่อประสิทธิภาพการผลิตและความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์สำหรับโพรไบโอติก (Sornplang & Piyadeatsoontorn, 2016)

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้มีข้อจำกัดบางประการที่ควรพิจารณาในการวิจัยในอนาคต เช่น การทดสอบเสถียรภาพการเจริญเติบโตในระยะยาวและในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ในสภาวะที่มี pH ต่ำหรือในสภาวะที่มีเกลือแร่สูง เพื่อจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมเพื่อระบุการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยให้เข้าใจกลไกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ด้วย ARTP ได้ดียิ่งขึ้น

จากผลการทดสอบ cell-free supernatant ของ *L. plantarum* สายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ โดยเฉพาะ LPM2 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ผลลัพธ์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2019) ที่พบว่าการใช้เทคนิค ARTP สามารถเพิ่มการผลิตกรดแลคติกและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *L. bulgaricus* ได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาของเราแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* MRSA และ *A. baumannii* ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่สำคัญทางคลินิก ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ไม่ได้รายงานผลต่อเชื้อเหล่านี้

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า *L. casei* และ *L. acidophilus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2020) ที่พบว่าการใช้ ARTP สามารถเพิ่มการผลิตสารต้านจุลชีพของ *L. rhamnosus* ได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่

เพิ่มขึ้นต่อเชื้อก่อโรคที่หลากหลายกว่า รวมถึงเชื้อ *P. aeruginosa* MDR ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในการติดเชื้อในโรงพยาบาล

นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อก่อโรค ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Zhang *et al.* (2018) ที่พบว่า *L. plantarum* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย ARTP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากความแตกต่างในสภาวะการเพาะเลี้ยงหรือระยะเวลาในการ exposed ARTP ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ cell-free supernatant จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่ผ่านการปรับปรุงด้วยเทคนิคพลาสมาอุณหภูมิห้อง (ARTP) ในการยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สนใจหลากหลายชนิดด้วยเทคนิค Broth Microdilution พบว่าศักยภาพของสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการปรับปรุงพันธุกรรม และอาจนำไปสู่การพัฒนาทางเลือกใหม่ในการรักษาการติดเชื้อที่ดื้อยา

ผลการทดสอบพบว่า cell-free supernatant จาก *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและที่ผ่านการปรับปรุงด้วย ARTP มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 6.25-50% และค่า MBC อยู่ในช่วง 12.5-50% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arqués *et al.* (2015) ที่รายงานว่า cell-free supernatant จาก *L. rhamnosus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ได้

อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบครั้งนี้ยังพบว่า cell-free solution จาก *Lactobacillus spp.* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดื้อยาหลายชนิด เช่น *E. coli* ESBL, *E. faecalis* VRE และ *S. aureus* MRSA ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Sharma *et al.* (2017) ที่รายงานว่า cell-free supernatant จาก *L. plantarum* ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* MRSA ได้ ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลมาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ARTP ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจส่งผลให้แบคทีเรียผลิตสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

นอกจากนี้ ยังพบว่า cell-free supernatant จาก *Lactobacillus spp.* มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vilela *et al.* (2015) ที่รายงานว่า cell-free

supernatant จาก *L. acidophilus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* ได้ อย่างไรก็ตาม ค่า MIC และ MFC ที่พบในการศึกษาของเรา (25-50%) สูงกว่าที่รายงานในงานวิจัยดังกล่าว (6.25-12.5%) ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียและวิธีการเตรียม cell-free solution

ที่น่าสนใจคือ cell-free supernatant จาก *L. plantarum* ที่ผ่านการปรับปรุงด้วย ARTP (LPM 1, LPM 2, LPM 3) แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* MRSA และ *P. aeruginosa* MDR ได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (LP non) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2016) ที่รายงานว่าการใช้เทคนิค ARTP สามารถเพิ่มการผลิตสารต้านจุลชีพในแบคทีเรียกรดแลคติกได้

อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบในครั้งนี้นับพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของ cell-free supernatant จาก *Lactobacillus spp.* ยังต่ำกว่ายาปฏิชีวนะ Amikacin ที่ใช้เป็น positive control ซึ่งมีค่า MIC และ MBC ที่ 12.5% สำหรับเชื้อแบคทีเรียทุกชนิด ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพของ cell-free supernatant ให้สูงขึ้น เช่น การหาวิธีเพิ่มความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ หรือการผสมผสาน cell-free supernatant จาก *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ

การตรวจสอบผลของการปรับปรุงพันธุกรรมด้วยเทคนิค Room-Temperature Plasma (ARTP) ต่อความไวของเชื้อ *Lactobacillus spp.* ต่อยาปฏิชีวนะ ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจในรูปแบบความไวต่อยาปฏิชีวนะของสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดที่ว่า การกลายพันธุ์สามารถส่งผลต่อคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Cotter & Hill, 2003)

ในกรณีของ *L. plantarum* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์แสดงความไวต่อยา Ceftriaxone และ Imipenem ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ LPM 1 และ LPM 2 ซึ่งแสดงโซนยับยั้งที่กว้างกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างชัดเจน ผลลัพธ์นี้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าของ Guo และคณะ (2017) ที่พบว่า *L. plantarum* มักจะดื้อต่อยากลุ่ม β -lactams รวมถึง Ceftriaxone ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างผนังเซลล์หรือการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ซึ่งเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค ARTP

ในส่วนของ *L. casei* พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ LCM 1 และ LCM 3 แสดงความไวต่อยา Doxycycline ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีโซนยับยั้งที่กว้างกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 1.5 เท่า ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Abriouel และคณะ (2015) ที่พบว่าการกลายพันธุ์สามารถเพิ่มความไวต่อยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียกรดแลคติกได้ อย่างไรก็ตาม ความไวต่อยา Gentamicin ของสายพันธุ์ LCM 1 และ LCM 3 กลับลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์อาจส่งผลต่อกลไกการดื้อยาที่แตกต่างกันสำหรับยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด

สำหรับ *L. acidophilus* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งสามสายพันธุ์มีความไวต่อยา Amikacin, Ceftriaxone และ Doxycycline ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ LAM 1 ที่แสดงโซนยับยั้งที่กว้างที่สุดสำหรับยาทั้งสามชนิด ผลลัพธ์นี้แตกต่างจากการศึกษาของ Goldstein และคณะ (2015) ที่รายงานว่า *L. acidophilus* มักจะดื้อต่อยา Aminoglycosides รวมถึง Amikacin ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ที่ทำลายยาปฏิชีวนะ หรือการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ส่งผลต่อการนำเข้าของยา

เป็นที่น่าสนใจว่า *Lactobacillus* ทั้งสามสายพันธุ์ ยังคงแสดงความไวต่อยา Vancomycin แม้จะผ่านการกลายพันธุ์แล้วก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Klein และคณะ (2000) ที่พบว่าความไวต่อ Vancomycin เป็นคุณสมบัติที่มีมาแต่กำเนิดของ *Lactobacillus spp.* และมักจะไม่ถูกระงับจากการกลายพันธุ์ ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าการดื้อยา Vancomycin ในเชื้อ *Lactobacillus* เป็นลักษณะที่มีความเสถียรสูงและอาจเกี่ยวข้องกับโครงสร้างพื้นฐานของผนังเซลล์

โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค ARTP ในการสร้างการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus spp.* สามารถเพิ่มความไวต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มยา Amikacin, Ceftriaxone และ Doxycycline อย่างไรก็ตาม ผลกระทบของการกลายพันธุ์ต่อความไวของยาแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงความซับซ้อนของกลไกการดื้อยาในแบคทีเรีย ผลการวิจัยนี้เปิดโอกาสสำหรับการพัฒนาสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารและการแพทย์ โดยการเพิ่มความปลอดภัยในการใช้งานผ่านการเพิ่มความไวต่อยาปฏิชีวนะ

ผลการทดสอบศักยภาพของ cell-free supernatant จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อผ่านการปรับปรุงพันธุกรรมด้วยเทคนิคการกลายพันธุ์ ผลการวิจัยนี้อาจช่วยส่งเสริมการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งธรรมชาติ ที่อาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางในอนาคต

ผลการทดสอบพบว่า cell-free supernatant จาก *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH inhibition test ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li *et al.* (2012) ที่รายงานว่า cell-free supernatant จาก *L. plantarum* C88 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า DPPH radical scavenging activity สูงถึง 53.05% ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์บางสายพันธุ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะใน *L. plantarum* สายพันธุ์ LPM3 ที่มีค่า % DPPH inhibition สูงถึง 64.63% เทียบกับ 52.47% ในสายพันธุ์ดั้งเดิม และใน *L. casei* สายพันธุ์ LCM1 ที่มีค่า % DPPH inhibition 64.20% เทียบกับ 52.20% ในสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกให้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และ Yen (1999) ที่รายงานว่า การกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาสามารถเพิ่มการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในแบคทีเรีย *Streptococcus thermophilus* ได้

นอกจากนี้ ยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ cell-free supernatant จาก *Lactobacillus spp.* มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โดย *L. plantarum* และ *L. casei* มีแนวโน้มที่จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า *L. acidophilus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amaretti *et al.* (2013) ที่พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรีย *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์และขึ้นอยู่กับสภาวะการเพาะเลี้ยง

ที่น่าสนใจคือ ค่า VCEAC (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity) ของ cell-free supernatant จาก *Lactobacillus spp.* จากผลการทดสอบในครั้งนี้มีค่าสูงถึง 302-426 µg Vitamin C equivalents ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระทางธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ค่านี้ยังต่ำกว่าที่พบในผลไม้บางชนิด เช่น สตรอเบอร์รี่ ที่มีค่า VCEAC สูงถึง 2,000-

3,000 µg/g น้ำหนักสด (Halvorsen *et al.*, 2002) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ให้สูงขึ้น

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารฟลาโวนอยด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ทั้งในรูปแบบสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ (mutant type) ผลการวิจัยนี้ไม่เพียงแต่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *Lactobacillus spp.* ในฐานะแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ แต่ยังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการปรับปรุงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มการผลิตสารฟลาโวนอยด์ในแบคทีเรียกลุ่มนี้

ผลการทดลองพบว่า cell-free supernatant จาก *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตสารฟลาโวนอยด์ โดยมีปริมาณ Total Flavonoid Content อยู่ในช่วง 29.95-42.76 µg Quercetin equivalents ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mousavi *et al.* (2013) ที่รายงานว่า *L. plantarum* สามารถผลิตสารฟลาโวนอยด์ได้ โดยพบปริมาณ Total Flavonoid Content ในช่วง 20-50 µg Catechin equivalents/mL ในน้ำผลไม้ที่หมักด้วยแบคทีเรียชนิดนี้

อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบครั้งนี้ยังพบความแตกต่างที่น่าสนใจระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ โดยเฉพาะใน *L. plantarum* สายพันธุ์ LPM3 ที่มีปริมาณ Total Flavonoid Content สูง ถึง 41.76 µg Quercetin equivalents เทียบกับ 32.45 µg Quercetin equivalents ในสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์อาจส่งผลให้เกิดการเพิ่มการผลิตสารฟลาโวนอยด์ในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2018) ที่รายงานว่า การกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตสามารถเพิ่มการผลิตสารฟลาโวนอยด์ในเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้

ในทางกลับกัน การศึกษาของเราพบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์บางสายพันธุ์ เช่น *L. casei* LCM1 และ *L. acidophilus* LAM3 มีปริมาณ Total Flavonoid Content ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ ในทางลบ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu *et al.* (2015) ที่พบว่า การกลายพันธุ์อาจส่งผลให้เกิดการลดลงของการผลิตสารทุติยภูมิในจุลินทรีย์บางสายพันธุ์

นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างของปริมาณ Total Flavonoid Content ระหว่างสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* โดย *L. casei* มีแนวโน้มที่จะผลิตสารฟลาโวนอยด์ได้มากกว่า *L. plantarum* และ *L. acidophilus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hur *et al.* (2014) ที่รายงานว่าความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์

ผลของการใช้เทคนิคพลาสมาอุณหภูมิห้อง (Room-Temperature Plasma; RTP) ในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Lactobacillus spp.* ต่อความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและความเสถียรของสายพันธุ์ มีนัยสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเฉพาะทางและความเสถียรสูง ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางเพื่อสุขภาพในอนาคต

ผลการทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ (Strain Stability) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค RTP ของ *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. acidophilus* มีความสามารถในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นและความเสถียรมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม สอดคล้องกับการศึกษาของ Li *et al.* (2020) ที่พบว่า *L. plantarum* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย RTP มีการผลิตกรดแกมมา-อะมิโนบิวทิริก (GABA) เพิ่มขึ้นและความเสถียรสูงถึง 30 รุ่น อย่างไรก็ตาม การศึกษาของเราแสดงให้เห็นถึงความเสถียรในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน โดยสามารถรักษาระดับการยับยั้ง DPPH ได้สูงถึง 15 รุ่น

นอกจากนี้ ผลการทดลองของเรายังแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้ง DPPH ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน *L. plantarum* และ *L. casei* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2019) ที่พบว่า *L. bulgaricus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย RTP มีการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบยังแสดงให้เห็นถึงความเสถียรของการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า โดยสามารถรักษาระดับการยับยั้ง DPPH ได้นานถึง 15 รุ่น ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้นี้รายงานความเสถียรเพียง 10 รุ่น

ที่น่าสนใจคือ ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ของ *L. acidophilus* แสดงความเสถียรในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Wang *et al.* (2021) ที่พบว่า *L. acidophilus* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นมี

ความเสถียรในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากประสิทธิภาพของเทคนิค ARTP ในการสร้างการกลายพันธุ์ที่มีประโยชน์และคงทนมากกว่าวิธีการดั้งเดิม

อย่างไรก็ตาม ยังพบความแปรปรวนเล็กน้อยในความสามารถการยับยั้ง DPPH ของสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์บางสายพันธุ์ เช่น *L. plantarum* LAM3 และ LA non (Wild type) ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างการกลายพันธุ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2018) ที่พบว่า การกลายพันธุ์ด้วย ARTP อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่หลากหลาย ซึ่งอาจส่งผลต่อความเสถียรของสายพันธุ์ในระยะยาว

โดยสรุป ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิค ARTP สามารถปรับปรุงความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของ *Lactobacillus spp.* และเพิ่มความเสถียรของสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงและมีความเสถียรในการผลิตระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการระบุชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตโดย *Lactobacillus spp.* และกลไกการเพิ่มการผลิตเหล่านี้ในสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ และความเสถียรของสายพันธุ์จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้นในอนาคต นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาความเป็นพิษและความปลอดภัยของ cell-free supernatant จากสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเครื่องสำอาง

บรรณานุกรม

- Abriouel, H., Casado Muñoz, M. D., Lavilla Lerma, L., Pérez Montoro, B., Bockelmann, W., Pichner, R., & Gálvez, A. (2015). New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*, 78, 465-481.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.016>
- Amaretti, A., di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., & Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 809-817. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4241-7>
- Arjunan, K.P.; Sharma, V.K.; Ptasińska, S.(2015) Effects of Atmospheric Pressure Plasmas on Isolated and Cellular DNA—A Review. *Int.J. Mol. Sci.*, 16, 2971–3016. [CrossRef]
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J. M., & Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*, 2015, 584183. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. Turck C., M., (1966) Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 45, Issue 4_ts, 493–496.
- Chen, Y., Lin, H., Li, Z., & Mou, J. (2017). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, 9(1), 3-9.
- Chen, Y., Wu, J., Yi, Y., Bai, L., & Jin, Y. (2018). Responses of *Lactobacillus acidophilus* to acid stress: Physiological, proteomic and metabolomic profiles. *Microbiological Research*, 216, 47-59.
- CLSI. 2018. M07: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 11th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40(5), 539-558.

- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 429-453.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>
- EUCAST. 2022. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, version 10.0. www.eucast.org. Accessed November 30, 2022.
- Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., & Citron, D. M. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S98-S107. <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>
- Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., Zhang, H., & Zhang, W. (2017). Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. *Journal of Food Science*, 82(3), 724-730. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>
- Halvorsen, B. L., Holte, K., Myhrstad, M. C., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S. F., Wold, A. B., Haffner, K., Baugerød, H., Andersen, L. F., Moskaug, Ø., Jacobs Jr, D. R., & Blomhoff, R. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 461-471. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.461>
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I., & Kim, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346-356.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
- Jiang, H.; Zou, J.; Cheng, H.; Fang, J.; Huang, G. (2017) Purification, Characterization, and Mode of Action of Pentocin JL-1, a Novel Bacteriocin Isolated from *Lactobacillus pentosus*, against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Res. Int.*, 7657190. [CrossRef]
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (2000). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(1), 103-125.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X)
- Li, G.; Li, H.-P.; Wang, L.-Y.; Wang, S.; Zhao, H.-X.; Sun, W.-T.; Xing, X.-H.; Bao, C.-Y. (2008) Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium. *Appl. Phys. Lett.*, 92, 221504. [CrossRef]

- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., & Lv, J. (2020). Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2243-2254. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10347-y>
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048>
- Li, X., Liu, Y., Wu, Y., Tian, Y., Zhang, G., & Ahmad, H. (2019). Mutation breeding of *Lactobacillus bulgaricus* using atmospheric and room temperature plasma. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 836-842. <https://doi.org/10.1002/fsn3.935>
- Li, X., Zhang, H., Liu, Y., Chen, X., & Ren, D. (2021). Comparison of ARTP mutagenesis and traditional mutagenesis in strain improvement of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 130(5), 1491-1502.
- Lin, M. Y., & Yen, C. L. (1999). Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1460-1466. <https://doi.org/10.1021/jf981149l>
- Liu, K.; Fang, H.; Cui, F.; Nyabako, B.A.; Tao, T.; Zan, X.; Chen, H.; Sun, W. (2020) ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104, 6363–6373.
- Liu, Y., Xu, Y., & Zhao, F. (2018). Application of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and adaptive laboratory evolution (ALE) biotechnologies in microbial breeding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(12), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2557-y>
- Liu, Y., Ye, X., Feng, X., Zhou, G., Lv, X., & Tan, Z. (2018). In-depth investigation of a novel bioactive substance 7, 8-dihydroxycoumarin from lactic acid bacteria and its application in food preservation. *Food Chemistry*, 290, 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.079>
- Liu, Y., Zhao, X., Zou, L., & Zhao, H. (2018). Enhanced production of vitamin B12 by ARTP mutagenesis in *Lactobacillus plantarum*. *Molecules*, 23(10), 2492.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371-394.

- Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2018). Probiotic yogurt production under high pressure and the possible use of pressure as an on/off switch to stop/start fermentation. *Process Biochemistry*, 65, 17-23.
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123-128. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1>
- Nichapha A. (2557). การคัดแยกและจำแนกพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่คัดแยกจากอาหารหมักท้องถิ่นภาคใต้. วารสารเกษตรพระวรุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม, 8(1), 1-10.
- Ottenheim, C.; Nawrath, M.; Wu, J.C. (2018) Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): The latest development. *Bioresour. Bioprocess.*, 5, 12. [CrossRef]
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Vilchez-Padial, L. M., & Gil, A. (2019). Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients*, 11(9), 2279.
- Salminen, S., von Wright, A. (2019). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press.
- Sharma, C., Singh, B. P., Thakur, N., Gulati, S., Gupta, S., Mishra, S. K., & Panwar, H. (2017). Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotech*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0591-7>
- Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*, 58(1), 26.
- Tan, G. T., et al. (2009). "Antioxidant constituents of the rhizomes of *Alpinia mutica*." *Molecules* 14(12): 4690-4699.
- Vilela, S. F., Barbosa, J. O., Rossoni, R. D., Santos, J. D., Prata, M. C., Anbinder, A. L., Jorge, A. O., & Junqueira, J. C. (2015). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*, 6(1), 29-39. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486>

- Wang, H. K., Xin, Y. J., Yin, J. Y., Shao, Q. S., & Qu, W. J. (2016). Genome shuffling and gentamicin-resistance to improve ϵ -poly-L-lysine productivity of *Streptomyces albulus* W-3. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(8), 1601-1617.
<https://doi.org/10.1007/s12010-016-2190-9>
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., Min, W., & Yang, Z. (2019). Characterization and evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds from *Lactobacillus plantarum* strains with random UV mutagenesis. *Food Chemistry*, 294, 403-413.
- Wang, J., Wu, T., Fang, X., Min, W., & Yang, Z. (2021). Characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* JLK0142 isolated from fermented dairy tofu. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 1012-1025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.029>
- Wang, L., Xue, Y., Li, J., & Lu, F. (2019). Response of *Lactobacillus plantarum* to low-temperature stress: A comparative proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 202, 103375.
- Wang, L.; Huang, Z.; Li, G.; Zhao, H.; Xing, X.; Sun, W.; Li, H.; Gou, Z.; Bao, C. (2010) Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *J. Appl. Microbiol.*, 108, 851–858.
- Wang, P. M., Choera, T., Wiemann, P., Pisithkul, T., Amador-Noguez, D., & Keller, N. P. (2018). TrpE feedback mutants reveal roadblocks and conduits for β -lactam overproduction in *Aspergillus nidulans*. *Metabolic Engineering*, 49, 194-204.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.009>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, J., Xiao, J., Wang, Y., & Guo, Y. (2020). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 157.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00157>
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Fu, A., Gong, L., Li, W., & Li, Y. (2020). *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 alleviates the oxidative stress of IPEC-1 via modulating Nrf2/Keap1 signaling pathway and decreasing ROS production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2173-2184.

- Xu, J.-Z.; Zhang, W.-G. (2017) Menaquinone-7 production from maize meal hydrolysate by *Bacillus* isolates with diphenylamine and analogue resistance. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 18, 462–473. [CrossRef]
- Zhang, Y., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., & Yang, Z. (2020). Growth and stress tolerance of *Lactobacillus casei* Zhang decreased with simulated digestion and storage but were partially improved by the protective effect of whey protein isolate. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 7714-7723.
- Zhang, Y., Lin, J., Zhong, Q., Zhang, H., Yu, Z., & Zhang, W. (2019). In vitro and in vivo antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan kefir. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 7577-7587.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Hu, P., Wang, Y., & Hou, B. (2018). Mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* by atmospheric pressure room temperature plasmas and investigation of its probiotic properties. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1517-1528.
<https://doi.org/10.1111/jam.13725>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Hu, P., Wang, Y., & Hou, B. (2019). Mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* by atmospheric pressure room temperature plasmas and investigation of its probiotic properties. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1312-1324.
<https://doi.org/10.1111/jam.14362>
- Zhu, L.; Xu, Q.; Jiang, L.; Huang, H.; Li, S. (2014) Polydiacetylene-Based High-Throughput Screen for Surfactin Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, 9, e88207. [CrossRef]
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q. (2015). Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry*, 165, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.034>

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

TSB + 0.6% yeast extract + 1% agar

TSB	30.0	g
Agar	10.0	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 L โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

5.5 การเตรียม Suspending Medium

TSB	30.0	g
Glycerol	200.0	ml
น้ำกลั่น	1000.0	ml

Mix final volume 20 % Glycerol in Trypticase Soy Broth

แบ่งใส่หลอด Cryotube หลอดละ 1-2 ml นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 10 นาที

วิธีเตรียม Muller Hinton broth

- เตรียม Muller Hinton broth 21 g ในน้ำกลั่น 1000 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีเตรียม Potato Dextrose Agar

Potato Dextose	39	g
Agar	5	g
DW	1000	mL.

วิธีทำ

ผสมให้เข้ากันดี ปิดจุกสำลี หุ้มกระดาษ รัดหนังยาง นำไป Auto clave 121 °C นาน 15 นาที นำไป
แกว่งกับน้ำให้อุ่นๆประมาณ 40 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากันดี แล้วจึงเท Plate

วิธีเตรียม RPMI-1640 (1L)

RPMI-1640 powder	10.4	g (Biochrom AG, Berlin)
Sodiumbicarbonate	2.0	g
L-glucose	2.5	g

10 mM HEPES	2.383	g
1 mM sodiumpyruvate	10	mL
Double distilled water	1	L

วิธีทำ

ปรับ pH ให้ได้ 7.1 กรองด้วย 0.22 μ m milipore เก็บที่ 4 °C

สารเคมี

Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7

เตรียมสารละลายต่างๆดังนี้

วิธีเตรียมสารละลาย 0.85% NaCl

NaCl	0.85	g
น้ำกลั่น	100	ml

วิธีเตรียมสารละลาย resazurin indicator (0.18%)

น้ำปริมาตร 100 mL มี resazurin 0.18 g

น้ำปริมาตร 50 mL มี resazurin $(0.18 \times 50) / 100 = 0.09$ g

ดังนั้น เตรียม resazurin 0.09 g จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml แล้ว นำมากรองด้วย Syringe Filter ขนาดรู

พรุน 0.22 μ m เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 mm



ประวัติผู้วิจัย

คำนำหน้า ☐ นาย ☒ นาง ☐ นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ☐ ศ. ☐ รศ. ☒ ผศ. ☐ อื่นๆ _____ ดร. _____
 ชื่อผู้วิจัย พรรณณา
 นามสกุลผู้วิจัย เกาทอง
 ชื่อภาษาอังกฤษ Pannapa
 นามสกุลภาษาอังกฤษ Powthong
 ที่อยู่(บ้าน) 84/27 หมู่ 5 ตำบล บางพูน อำเภอ เมือง จังหวัด ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์(บ้าน) 12000
 โทรศัพท์(บ้าน) -
 แฟกซ์ (บ้าน) -
 ที่อยู่(ที่ทำงาน) 52/347 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต หมู่บ้านเมืองเอก
 ถนนพหลโยธิน ต. หลักหก อ. เมือง จ. ปทุมธานี
 จังหวัด(ที่ทำงาน) ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน) 12000
 โทรศัพท์(ที่ทำงาน) 0-2997-2222 ต่อ 1408
 แฟกซ์(ที่ทำงาน) 0-2997-2200 ต่อ 5577
 E-Mail Address : pannapa_pt@yahoo.com

ปริญญาตรี

สาขา คณะเทคนิคการแพทย์
 ปีที่จบ 2544
 สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
 ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา เวชศาสตร์เขตร้อน
 ปีที่จบ 2549
 สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล

ประเทศ ไทย

Post-Doctoral fellowship under the Tokyo Biochemical Research Foundation (TBRF) at Department of Appropriate Technology Development and Transfer, Research Institute, International Medical Center of Japan Ministry of Health Labour and Welfare of Japan.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารภายในประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ(โปรดระบุวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

1. Pannapa Susomboon, Yaowapa Maneerat, Paron Dekumyoy, Thareerat Kalambaheti, Moritoshi Iwagami, Kanako Komaki- Yasuda, Shinichiro Kawazu, Noppadon Tangpukdee, Sornchai Looareesuwan, Shigeyuki Kano. Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, *Parasitology International*, Vol. 55 , 107-112, 2006.
2. Pannapa Susomboon, Moritoshi Iwagami, Noppadon Tangpukdee, Srivicha Krusood, Sornchai Looareesuwan, and Shigeyuki Kano. Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis, *Malar J.* 2008 Oct 21; 7:212.
3. Pannapa Powthong, Moritoshi Iwagami, Sornchai Looareesuwan, and Shigeyuki Kano. Early adhesion molecule induction by cytoadherence of malaria-infected red blood cells and comodulation of immune cells: the roles of parasite adhesion and time course, preparing for submit.
4. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Evaluation of the Endophytic Fungi Extract for their Antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research (IJPBR)*. 2012, 3(2), 132-136.

5. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Screening of Antimicrobacterial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers., J Agri Sci Tech. Vol. 15, Supplementary issue, December 2013.
6. Pannapa Powthong, Acharawan Thongmee, Pattra Suntornthiticharoen. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. International Journal of Phytomedicine (IJPM). 2013, Vol. 5.102-7.
7. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antibacterial and Probiotic Properties of lactic acid bacteria isolated from chicken intestine, entrails of swine, and soil against gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS). 2014, Vol. 3.
8. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antibacterial activity of Probiotic bacteria isolated from Thai traditional fermented food on gastrointestinal and urogenital pathogenic bacteria, Pakistan Journal of Nutrition 14 (2): 2015: 67-74.
9. Pannapa powthong, Bajaree jantrapanukorn, Pattra suntornthiticharoen. Isolation, identification and analysis of DDT-degrading bacteria for agriculture area improvements, Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.14 (1): 2016:139-144.
10. Pannapa powthong, Bajaree jantrapanukorn, Pattra suntornthiticharoen. Isolation, characterization and identification of Roundup degrading bacteria from the agricultural area of Thailand, Asian Journal of Microbiology. Biotechnology and Environmental Science Vol. 18, No. (2) : 2016 : 11-16.

11. Bajaree Jantrapanukorn, Sawanya Pongpraritt, Pannapa Powthong, Thanet Pheungphu. The study of antibacterial activity in enteric pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) by broth micro-dilution method. Journal of Applied Pharmaceutical Science, Vol. 7 (5) : 2016 : 119-122.
12. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Antimicrobial and enzyme activity produced by bacillus spp. isolated from soil. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 9(3), 2017:205-210.
13. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Screening of active antimicrobial and biological enzymes of microbial isolated from soil in Thailand. Asian J Pharm Clin Res, Vol 10(4) 2017, 73-78.
14. Pannapa powthong, Pattra suntornthiticharoen. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from agriculture area in Thailand. Bugarian journal of agricultural science, Vol. 24 (No 4) 2018, 623–630.
15. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Pattra Suntornthiticharoen, Kamlai Laohaphatanalert. Study of prebiotic properties of selected banana species in Thailand. Journal of Food Science and Technology, Vol. 57 (7) 2020, 2490–2500.
16. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Pattra Suntornthiticharoen and Chitradee Luprasong. An in vitro study on the effects of selected natural dietary fiber from salad vegetables for lowering intestinal glucose and lipid absorption. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 12, 2021,58-62.

17. Pannapa Powthong, Adun Bunchaleamchai, Nipaporn Tewawong, Siriporn Kowaboot, Apichai Sreepian, Rungnapa Veeramano. Evaluation of the fabric facemasks efficacy in reducing airborne transmitted bacteria exposure, in vitro study. *International Journal of Medical Toxicology & Legal Medicine*, 24, 2021, 9-13.
18. Pannapa Powthong, Warangkana Lektrakul, Bajaree Juntrapanukorn, Chitradee Luprasong, Chaowalit Monton. Phytochemical analysis and potential applications of the ethanol and aqueous-ethanol extracts of some selected plant in family Zingiberaceae plants for cosmeceutical and health-promoting food. *Journal of Medical Society*. 36(2), May-August 2022: 69-77.
19. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Warangkana Lektrakul. Antimicrobial activity and safety applications of electrolyzed water as a microbial disinfectant. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences* 11(6), 2022: 5217–5220.
20. Pannapa Powthong, Bajaree Jantrapanukorn, Warangkana Lektrakul. The Bactericidal Effects and Safety Applications of Ozone Generator Using as Microbial Disinfectant. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences* 12(6), 2022: 2320 – 7418.
21. Pannapa Powthong, and Pattra Suntornthiticharoen. Comparative analysis of antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitory activities of *Centella asiatica* (L.) Urb and *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences* 12(4), 2023: xxxx–xxxx.
22. Boontarika Thongdonphum, Kittima Vanichkul, Adun Bunchaleamchai and **Pannapa Powthong**. In Vitro Antimicrobial Activity of *Nymphaea pubescens* (Pink Water Lily) Leaf Extracts. *Plants* 2023, 12, 3588. <https://doi.org/10.3390/plants12203588>.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการภายในประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Oral Presentation on “Early induction of adhesion molecule in endothelial cells by *P. falciparum* - infected red blood cells (PRBC) with the co-stimulation of immunocompetent cells” Joint International Tropical Medicine Meeting 2005, Bangkok, 30 November – 2 December 2005.
2. Oral Presentation on “Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes” RGJ Seminar Series XLI , Trends and research in Parasitology, Bangkok, 2 Feb 2006.
3. Oral Presentation on “Population genetic structure of *Plasmodium falciparum* in the Thai-Myanmar border region - microsatellite DNA analysis” Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, Bangkok, 29-30 November 2007.
4. Poster Presentation on “การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน” (Screening of Antimicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) RSU conference 2010
5. Oral Presentation on “ Characterization of antibiofilm activity of biosurfactant producing bacteria ” The 41st Congress on Science and Technology of Thailand (STT41), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand 2015 (By Dr. Pattra Suntornthiticharoen; coworker)

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการในต่างประเทศ(โปรดระบุหัวข้อประชุม/สัมมนาและสถานที่ด้วย)

1. Poster Presentation on “Down-regulation of tight junction mRNAs in human endothelial cells co-cultured with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes” Molecular Parasitology Meeting 2006, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts, USA , 10-14 September 2006.
2. Oral Presentation on “Microsatellite DNA polymorphisms flanking pfert of *Plasmodium falciparum* suggested different modes of evolution of chloroquine resistance in Thailand and Vietnam” 48 th Annual meeting of Japanese society of tropical medicine, Oeta prefecture, Japan, 12-13 October 2007.
3. Oral Presentation on “Microsatellite DNA analyses revealed different genetic population structures of *Plasmodium falciparum* isolates from patients with different clinical outcomes – A study in the Thai-Myanmar border region” 77th Annual Meeting of Japanese Society of Parasitologists (JSP) 2008, Nagasaki prefecture, 2-4 April 2008.

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล(โปรแกรรางวัลที่ได้รับด้วย)

- 1.การตรวจกรองฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพของราเอนโดไฟต์ที่แยกจากต้นแคบ้าน (Screening of Antimicroicrobial Activities of the Endophytic Fungi from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. ได้รับรางวัลการเสนอผลงานวิจัย ประเภทโปสเตอร์ดีเด่น ประจำปี 2553 ที่ RSU conference 2010

บทความทางวิชาการที่ตีพิมพ์ในวารสาร(โปรแกรนวารสารที่ตีพิมพ์ด้วย)

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

จุลชีววิทยา, จุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก, เกษษวิทยา, โลหิตวิทยา, ปรสิตวิทยา, และอนุชีววิทยา

Enhancing the Biological Activity of *Lactobacillus* spp. by Room-Temperature Plasma (ARTP)

Pannapa Powthong

Department of Medical Sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Pathumthani, Thailand 12000

*Corresponding Author: E-Mail: pannapa.p@rsu.ac.th

Abstract

The escalating global crisis of multidrug-resistant pathogens necessitates innovative approaches to enhance antimicrobial and antioxidant properties of probiotic bacteria. This study investigated the application of Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis to improve the biological activities of three *Lactobacillus* species: *L. plantarum*, *L. casei*, and *L. acidophilus*. ARTP treatment parameters were optimized based on species-specific lethality curves, establishing optimal exposure windows of 7-9 seconds for *L. plantarum*, 4-5 seconds for *L. casei*, and 11-12 seconds for *L. acidophilus*, achieving target mortality rates of 80-90%. Systematic screening of ARTP-derived mutants revealed significant enhancements in both antimicrobial and antioxidant properties. Superior mutant strains demonstrated remarkable improvements in DPPH radical scavenging activity: *L. plantarum* LPM4 (24.6% increase), *L. casei* LCM1 (24.8% increase), and *L. acidophilus* LAM8 (60.19% increase) compared to wild-type strains. Antimicrobial spectrum analysis through agar well diffusion and broth microdilution revealed expanded inhibitory activity against clinically significant multidrug-resistant pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE), multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Notably, mutant strains acquired novel antimicrobial activities against previously

resistant pathogens while maintaining enhanced minimum inhibitory concentrations. Flavonoid content analysis corroborated antioxidant improvements, with *L. plantarum* LPM4 exhibiting a 28.7% increase in quercetin equivalents. Growth kinetic studies confirmed that genetic modifications did not compromise cellular fitness, with several mutant strains demonstrating superior growth rates. Antibiotic susceptibility profiling revealed altered resistance patterns, generally increasing sensitivity to β -lactam antibiotics while maintaining species-specific intrinsic resistance characteristics. Stability assessment over 15 generations confirmed maintenance of enhanced properties, supporting commercial viability. These findings demonstrate ARTP mutagenesis as an effective, environmentally friendly, and regulatory-compliant approach for developing next-generation probiotics with superior antimicrobial and antioxidant capabilities, offering promising applications in functional foods and therapeutic interventions against oxidative stress-related diseases and antibiotic-resistant infections.

Keywords: ARTP mutagenesis, *Lactobacillus* enhancement, antimicrobial activity, antioxidant capacity, probiotic optimization

Introduction

The emergence of multidrug-resistant (MDR) pathogens represents one of the most pressing challenges in contemporary global health, demanding innovative antimicrobial strategies beyond conventional antibiotic therapy (Ventola, 2015; WHO, 2024). This escalating crisis has catalyzed renewed interest in probiotic bacteria, particularly *Lactobacillus* species, which demonstrate remarkable potential as biological alternatives through their multifaceted mechanisms of action. These gram-positive, lactic acid-producing bacteria exhibit antimicrobial activity via bacteriocin production, competitive exclusion of pathogens, immune system modulation, and maintenance of intestinal barrier function (Hill et al., 2014; Sanders *et al.*, 2019). Recent advances

in microbiome research have further validated the therapeutic potential of *Lactobacillus* strains, with studies demonstrating their efficacy against antibiotic-resistant pathogens including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) (Palanisamy et al., 2024).

Despite their inherent therapeutic properties, the natural bioactivity of wild-type *Lactobacillus* strains is frequently constrained by limited expression of biosynthetic gene clusters responsible for antimicrobial peptide synthesis and secondary metabolite production (Zhang et al., 2021; Mu et al., 2023). This limitation significantly restricts their clinical efficacy and commercial viability, necessitating advanced strain improvement strategies. Traditional microbial enhancement approaches, including ultraviolet (UV) irradiation and chemical mutagenesis using agents such as ethyl methanesulfonate (EMS) and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), have historically dominated the field. However, these conventional methods suffer from substantial drawbacks including high cytotoxicity, non-specific genomic alterations, mutagenic instability, and potential safety concerns for subsequent human applications (Ammar et al., 2018; Chen et al., 2020).

The development of Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis technology has revolutionized microbial strain improvement by offering a sophisticated, environmentally sustainable alternative with superior mutation characteristics (Liu et al., 2020; Wang et al., 2024). ARTP employs precisely controlled ionized gases, typically argon or helium, to generate reactive oxygen and nitrogen species (RONS) that induce targeted DNA modifications while maintaining cellular viability (Wang et al., 2021). This technology demonstrates several advantages over traditional methods: enhanced mutation frequency, reduced cytotoxicity, improved genetic stability of induced mutations, and absence of hazardous chemical residues (Li

et al., 2023). The mechanism involves plasma-generated reactive species penetrating cell walls and membranes to interact directly with DNA, causing single and double-strand breaks, base modifications, and chromosomal rearrangements that can lead to beneficial phenotypic changes.

Contemporary research has extensively validated ARTP's efficacy across diverse microbial species, yielding remarkable improvements in bioactive compound production and stress tolerance. Notable successes include a 34.2% enhancement in surfactin production by *Bacillus subtilis*, demonstrating the technology's capacity to upregulate lipopeptide biosynthesis pathways (Xu et al., 2021). Similarly, ARTP-treated *Streptomyces avermitilis* exhibited a 21% increase in avermectin production, substantially improving its antiparasitic therapeutic potential (Wang et al., 2010). Recent investigations have extended ARTP applications to probiotic bacteria, with *Bacillus coagulans* demonstrating enhanced bile resistance and thermotolerance following ARTP mutagenesis combined with adaptive laboratory evolution (ALE) (Chen et al., 2020). Particularly relevant to the current study, ARTP-treated *Lactobacillus acidophilus* exhibited significantly improved acid tolerance, suggesting the technology's potential for enhancing probiotic survival under gastrointestinal stress conditions.

The integration of ARTP mutagenesis with *Lactobacillus* strain improvement represents a convergence of advanced biotechnology and probiotic science that addresses critical limitations in current therapeutic applications. Recent proteomic analyses have revealed that ARTP-induced mutations can upregulate multiple metabolic pathways simultaneously, including amino acid biosynthesis, stress response mechanisms, and secondary metabolite production (Zhang et al., 2024). This multi-pathway enhancement is particularly valuable for probiotic applications, where strain robustness and bioactivity must be optimized concurrently. Furthermore, the growing interest in next-generation probiotics (NGPs) as biotherapeutics that alter the gut microbiome and

affect various diseases underscores the timely relevance of advanced strain improvement technologies.

The global probiotics market, forecasted to reach \$126.7 billion by 2030 with a 9.8% compound annual growth rate, reflects increasing demand for enhanced probiotic formulations with superior therapeutic efficacy. This market expansion creates substantial opportunities for ARTP-enhanced *Lactobacillus* strains that demonstrate improved antimicrobial activity, enhanced stress tolerance, and augmented production of beneficial metabolites. Additionally, emerging research on the gut-brain axis and the role of probiotics in neurological health, metabolic disorders, and immune function regulation further emphasizes the need for optimized probiotic strains with enhanced bioactivity profiles (Martinez-Guryn et al., 2019; Cryan et al., 2020).

The application of ARTP mutagenesis to *Lactobacillus* species encompasses several critical research frontiers. These include enhancement of bacteriocin production for improved antimicrobial efficacy, augmentation of exopolysaccharide synthesis for enhanced prebiotic activity, optimization of acid and bile tolerance for improved gastrointestinal survival, and upregulation of antioxidant enzyme production for enhanced oxidative stress resistance (Kim et al., 2022). Recent studies have also explored the potential of ARTP-induced mutations to enhance the production of gamma-aminobutyric acid (GABA), vitamin B12, and other neuroactive compounds that contribute to the psychobiotic effects of certain *Lactobacillus* strains (Strandwitz, 2018; Pokusaeva et al., 2017).

This comprehensive study aims to systematically investigate the effects of ARTP mutagenesis on *Lactobacillus* species, with specific focus on enhancing their antimicrobial and antioxidant properties for next-generation probiotic applications. The primary objectives include: (1) optimization of ARTP exposure parameters to achieve maximum beneficial mutation rates

while maintaining cellular viability; (2) comprehensive characterization of mutant strains for enhanced antimicrobial activity against clinically relevant MDR pathogens; (3) evaluation of improved antioxidant capacity and stress tolerance mechanisms; (4) assessment of genetic stability and phenotypic consistency of induced mutations across multiple generations; and (5) investigation of the molecular mechanisms underlying ARTP-induced enhancements through integrated genomic, transcriptomic, and proteomic analyses.

The scope of this research encompasses the selection and evaluation of representative *Lactobacillus* wild-type strains, systematic ARTP mutagenesis optimization, high-throughput screening for superior mutant phenotypes, detailed biochemical and molecular characterization of selected strains, and preliminary assessment of their potential applications in pharmaceutical formulations and functional food development. This investigation is expected to provide fundamental insights into ARTP-mediated microbial enhancement mechanisms while contributing practical solutions for developing superior probiotic therapeutics. The findings will advance our understanding of plasma-induced mutagenesis in gram-positive bacteria and establish a foundation for future clinical applications of enhanced *Lactobacillus* strains in combating antibiotic resistance and oxidative stress-related diseases.

Materials and methods

Experimental Design and Study Framework

This investigation employed a comprehensive experimental approach to enhance the biological properties of *Lactobacillus* spp. through Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis. The study design encompassed four sequential phases: (1) optimization of ARTP mutagenesis parameters for maximum beneficial mutation induction while maintaining cellular viability, (2) systematic screening and characterization of mutant strains with enhanced

antimicrobial and antioxidant properties, (3) comprehensive evaluation of bioactive compound production and genetic stability across multiple generations, and (4) comparative assessment of therapeutic potential against multidrug-resistant pathogens. The experimental framework was designed according to current ARTP mutagenesis protocols with adaptations for probiotic enhancement applications (Zhang et al., 2023; Liu et al., 2020).

Bacterial Strains and Quality Control

Target *Lactobacillus* Species

Three clinically relevant *Lactobacillus* species were selected as target organisms: *L. plantarum*, *L. casei*, and *L. acidophilus*. These strains were chosen based on their established probiotic properties, commercial relevance, and documented susceptibility to beneficial genetic modifications through plasma mutagenesis (Chen et al., 2020). All strains were maintained as glycerol stocks at -80°C and subcultured on de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) at 37°C under microaerophilic conditions.

Pathogenic Test Organisms

A comprehensive panel of clinically significant multidrug-resistant pathogens was employed to evaluate antimicrobial efficacy, including: *Escherichia coli* extended-spectrum β -lactamase (ESBL), *Enterococcus faecalis* vancomycin-resistant enterococci (VRE), *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei*, *Acinetobacter baumannii* multidrug-resistant (MDR), *Pseudomonas aeruginosa* MDR, *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA), *Bacillus subtilis* (control strain), and *Candida albicans*. All clinical isolates were obtained from the Department of Medical Sciences, Faculty of Science, and Faculty of Medical Technology, Rangsit University, Thailand. Strain authentication and antimicrobial resistance profiles were confirmed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and disk

diffusion susceptibility testing according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2024) guidelines.

Reagents and Chemicals

All chemicals employed were of analytical grade and used without further purification. These included: sodium chloride (QReC, Auckland, New Zealand), absolute ethanol (UNILAB, Sydney, Australia), L-ascorbic acid (Chanjao Longevity Co., Bangkok, Thailand), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Smart Science Co., Bangkok, Thailand), quercetin dihydrate (Chanjao Longevity Co., Bangkok, Thailand), resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), aluminum trichloride hexahydrate (Sigma-Aldrich), and gentamicin sulfate (Sigma-Aldrich). All microbiological media were prepared according to manufacturer specifications and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

ARTP Mutagenesis Optimization and Mutant Generation

Pre-treatment Bacterial Preparation

Target *Lactobacillus* strains were cultured on MRS agar plates and incubated at 37°C for 24 hours to obtain actively growing, pure cultures. Individual well-isolated colonies were selected and suspended in sterile 0.85% (w/v) NaCl solution. Bacterial cell density was standardized using a McFarland nephelometer to achieve 0.5 McFarland standard (approximately 1.5×10^8 colony-forming units per milliliter [CFU/mL]), ensuring consistent cell concentrations across all mutagenesis experiments (McFarland, 1907; CLSI, 2024).

ARTP System Configuration and Mutagenesis Protocol

The ARTP mutagenesis was performed using a standardized atmospheric pressure plasma jet system (Tsinghua University, Beijing, China) configured with optimized parameters based on

recent studies demonstrating maximum beneficial mutation rates at approximately 90% lethality (Xu et al., 2023). The system was operated under the following standardized conditions: argon gas carrier (99.99% purity) at a flow rate of 10 L/min, radio frequency power input of 4.0 W, nozzle-to-sample distance of 2.0 mm, and treatment chamber maintained at ambient temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). A 10 μL aliquot of standardized bacterial suspension was dispensed onto sterile polystyrene plates and positioned directly beneath the plasma nozzle. Treatment durations ranged from 0 to 150 seconds in 30-second intervals to establish species-specific optimal exposure times.

Survivability Assessment and Lethal Dose Determination

Immediately following ARTP exposure, treated bacterial suspensions were serially diluted (10^{-1} to 10^6) in sterile 0.85% NaCl solution and plated on MRS agar using the spread plate technique. Plates were incubated at 37°C for 24-48 hours under microaerophilic conditions. Surviving colonies were enumerated using a digital colony counter, and experiments were performed in biological triplicate with technical triplicates for each dilution. Lethality rates were calculated using the formula:

$$\text{Lethality rate (\%)} = [1 - (\text{NT}/\text{NU})] \times 100 \quad (1)$$

where N_T represents colony counts in treated groups and N_U represents colony counts in untreated controls (Liu et al., 2020). Optimal treatment conditions were defined as those achieving 85-95% lethality while maintaining sufficient viable cells for subsequent screening procedures.

Mutant Screening and Primary Selection

Following optimization of ARTP parameters for each *Lactobacillus* species, systematic screening for enhanced antioxidant properties was conducted. Surviving colonies from optimal treatment conditions were individually isolated and cultured in MRS broth at 37°C for 24 hours.

Cell-free supernatants (CFS) were obtained by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C , followed by sterile filtration through $0.22 \mu\text{m}$ polyethersulfone membrane filters (Millipore, Bedford, MA, USA). Primary screening utilized DPPH radical scavenging assays to identify mutant strains exhibiting superior antioxidant capacity compared to their respective wild-type counterparts. Selection criteria prioritized strains demonstrating $\geq 20\%$ improvement in antioxidant activity relative to parental strains.

Growth Kinetics and Bioactive Compound Production Analysis

Standardized Culture Conditions and Growth Monitoring

Both wild-type and selected mutant strains were subjected to comprehensive growth kinetic analysis under controlled conditions. Bacterial suspensions were standardized to 0.5 McFarland standard and inoculated at 1% (v/v) into 50 mL MRS broth in 250 mL Erlenmeyer flasks. Cultures were incubated at 37°C with orbital shaking at 150 rpm for 24-48 hours. Growth dynamics were monitored by measuring optical density at 600 nm (OD_{600}) using a UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Evolution 220, Waltham, MA, USA). The obtained OD values were plotted to generate growth curves.

Cell-Free Supernatant Preparation and Standardization

At predetermined time points corresponding to late exponential phase (typically 18-24 hours), bacterial cultures were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 minutes at 4°C using a high-speed centrifuge (Sigma 3-30KS, Osterode am Harz, Germany). The resulting CFS was immediately filter-sterilized through $0.22 \mu\text{m}$ membrane filters and stored at -20°C for further analyzed to evaluate its antimicrobial activity against target microorganisms and its antioxidant properties. CFS samples were standardized based on original bacterial cell density to ensure

comparable bioactive compound concentrations across different strains and experimental conditions.

Antimicrobial Activity Assessment

Agar Well Diffusion Screening Assay

Primary antimicrobial screening employed a modified agar well diffusion technique adapted from EUCAST standardized protocols (EUCAST, 2024). Test pathogens were cultured on appropriate media (nutrient agar for bacteria, potato dextrose agar for yeasts) and incubated at 37°C for 24 hours. Bacterial/yeast suspensions were standardized to 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL for bacteria, 1.5×10^6 CFU/mL for yeasts) and uniformly distributed on Mueller-Hinton agar (MHA) plates using sterile cotton swabs in a three-directional pattern. Wells (6.0 mm diameter) were created using sterile cork borers, and 30 μ L volumes of CFS at various concentrations (25%, 50%, and 100% v/v) were dispensed into individual wells. Positive controls consisted of gentamicin (1.0 mg/mL) for bacteria and clotrimazole (1.0 mg/mL) for yeasts, while negative controls utilized sterile MRS broth. Plates were incubated at 37°C for 24 hours, and inhibition zone diameters were measured using digital calipers. Strains exhibiting inhibition zones of interest were selected for further testing.

Quantitative Antimicrobial Susceptibility Testing

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination

Quantitative antimicrobial activity was assessed using the broth microdilution method according to CLSI M07-A11 (2024) and EUCAST standards with modifications for probiotic supernatants. Test organisms were prepared as described above and diluted 1:100 in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) to achieve final concentrations of 5×10^5 CFU/mL for bacteria and 5×10^3 CFU/mL for yeasts. CFS samples demonstrating promising activity in agar

diffusion assays were serially diluted using two-fold dilution series in sterile 96-well microtiter plates (Corning Inc., Corning, NY, USA). Each well contained 100 μ L of diluted CFS and 100 μ L of standardized microbial inoculum. Control wells included: sterility control (CAMHB only), growth control (inoculum without CFS), and positive control (gentamicin at 0.125-128 μ g/mL).

Plates were sealed with sterile film and incubated at 37°C for 18-24 hours. Microbial growth was assessed using resazurin indicator (0.018% w/v) with 10 μ L added to each well followed by 1-hour incubation at 37°C. Color interpretation followed established protocols: blue/purple indicating growth inhibition (positive result), pink/colorless indicating no inhibition (negative result). MIC values were recorded as the lowest CFS concentration preventing visible microbial growth and were expressed as percentage concentrations (v/v) of original supernatant.

Minimum Bactericidal/Fungicidal Concentration (MBC/MFC) Determination

Wells demonstrating growth inhibition in MIC assays were further evaluated for bactericidal/fungicidal activity using the streak plate method adapted from CLSI guidelines (CLSI, 2024). Aliquots (10 μ L) from wells showing no visible growth were streaked onto tryptic soy agar plates and incubated at 37°C for 24-48 hours. MBC/MFC values were defined as the lowest CFS concentration resulting in $\geq 99.9\%$ reduction in viable counts compared to the initial inoculum, determined by absence of growth on recovery plates.

Antioxidant Activity Characterization

DPPH Radical Scavenging Assay

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Assay

Antioxidant capacity was quantified using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay adapted from established protocols (Powthong et al., 2022). CFS samples were serially diluted to final concentrations of 0.78%, 1.56%, 12.5%, 25%, 50%, and 100% (v/v)

in sterile distilled water. In 96-well microplates, 100 μL of each diluted sample was combined with 100 μL of freshly prepared DPPH solution (0.02 mg/mL in methanol). Reaction mixtures were thoroughly mixed using a plate shaker and incubated in darkness at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) for 30 minutes. Absorbance measurements were performed at 517 nm using a microplate reader (BioTek Synergy HTX, Winooski, VT, USA). Negative controls consisted of distilled water replacing CFS samples. Radical scavenging activity was calculated using the formula:

$$\text{DPPH Scavenging Activity (\%)} = \frac{[\text{Absorbance of Control} - \text{Absorbance of Sample}] / \text{Absorbance of Control}}{\times 100}$$

where A_{control} represents absorbance of negative control and A_{sample} represents absorbance of test samples.

Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) Determination

Quantitative antioxidant capacity was expressed in vitamin C equivalents using L-ascorbic acid standard curves. Standard solutions were prepared at concentrations of 7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125, 250, 500, and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ in methanol and tested under identical DPPH assay conditions. Linear regression analysis generated standard curves ($R^2 \geq 0.995$), and sample antioxidant capacities were calculated from the equation and expressed as micrograms of vitamin C equivalents per milliliter of CFS ($\mu\text{g VCE/mL}$).

Total Flavonoid Content Analysis

Flavonoid quantification employed the aluminum chloride colorimetric method modified from established protocols (Powthong et al., 2023). CFS samples were diluted to identical concentrations as DPPH assays, and 30 μL volumes were combined with 170 μL of 1% (w/v) aluminum trichloride solution in 96-well plates. Reaction mixtures were incubated at 30°C for 10 minutes, and absorbance was measured at 415 nm using the microplate reader. Quercetin dihydrate

served as the reference standard with concentrations ranging from 1-500 µg/mL. Total flavonoid content was calculated from the quercetin standard curve and expressed as micrograms of quercetin equivalents per milliliter of CFS (µg QE/mL).

Antibiotic Susceptibility Profiling

Antibiotic susceptibility patterns of both wild-type and mutant *Lactobacillus* strains were evaluated using the Kirby-Bauer disk diffusion method according to CLSI standards (Bauer et al., 1966; CLSI, 2024). Bacterial suspensions were standardized to 0.5 McFarland standard and uniformly distributed on MHA plates using sterile cotton swabs. Commercial antibiotic disks (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) were applied to plate surfaces including: cefoxitin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), doxycycline (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), and vancomycin (30 µg). Following 24-hour incubation at 37°C, inhibition zone diameters were measured and interpreted according to CLSI breakpoint criteria for lactobacilli where available, or general criteria for gram-positive bacteria. The data were presented as the mean ± standard deviation (SD) of triplicate experiments.

Genetic Stability Assessment

Multi-generational Passaging Protocol

The genetic stability of beneficial mutations was evaluated through systematic multi-generational passaging over 15 consecutive generations. This approach was designed to assess the consistency and heritability of enhanced phenotypic characteristics under selective pressure-free conditions (Songnaka et al., 2023). Both wild-type and mutant strains were standardized to 0.5 McFarland standard, and 75 µL aliquots were inoculated into 1.5 mL MRS broth (5% v/v inoculation ratio). Day 0 represented the initial inoculation, with duplicate cultures prepared: one stored at -80°C for later analysis and another incubated at 37°C for 24 hours.

Daily subculturing involved transferring 75 μ L of actively growing culture into fresh MRS broth, maintaining consistent inoculation ratios throughout the 15-day period. Cultures from generations 0, 3, 6, 9, 12, and 15 were harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 minutes at room temperature, and CFS samples were stored at -20°C until comprehensive analysis. This experimental design provided insight into mutation stability and potential genetic drift over extended cultivation periods.

Phenotypic Stability Evaluation

CFS samples from selected generations were subjected to identical antimicrobial and antioxidant analyses as described above. Comparative evaluation focused on maintenance of enhanced bioactivities relative to generation 0 baselines. Statistical analysis examined trends in activity levels across generations and identified any significant deterioration in beneficial phenotypes.

Statistical Analysis and Data Management

All experiments were conducted in biological triplicate with technical replicates where appropriate. Quantitative data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc test for multiple comparisons. Two-way ANOVA was employed for analyzing interactions between strain type and generation number in stability studies. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), with significance defined as $p < 0.05$. IC_{50} values for antioxidant activities were calculated using non-linear regression analysis with variable slope models.

Ethical Considerations and Biosafety

All experimental procedures involving pathogenic microorganisms were conducted under Biosafety Level 2 (BSL-2) conditions in accordance with institutional biosafety guidelines. Waste materials were appropriately decontaminated by autoclaving at 121°C for 15 minutes before disposal. The study protocol was reviewed and approved by the Institutional Biosafety Committee of Rangsit University (Approval No. RSU-IBC-2024-001).

Results and Discussion

Effects of ARTP Treatment on *Lactobacillus Spp.* Viability

The Atmospheric Room-Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis technique represents a paradigm shift in microbial strain improvement, leveraging non-thermal plasma technology to induce precise genetic modifications while preserving cellular integrity (Zhang et al., 2014; Fang et al., 2013). This advanced mutagenesis approach demonstrates significant advantages over traditional chemical and physical mutagenesis methods, including reduced environmental impact, enhanced control over mutation rates, and minimized cellular damage (Li et al., 2015).

The systematic evaluation of ARTP effects on three distinct *Lactobacillus* species (*L. plantarum*, *L. casei*, and *L. acidophilus*) revealed characteristic species-specific sensitivity profiles that directly correlate with their underlying physiological and genetic architecture. These differential responses establish a foundation for understanding how plasma-induced oxidative stress interacts with strain-specific cellular defense mechanisms (Chen et al., 2018; Bourke et al., 2018).

The temporal dynamics of ARTP-induced mortality followed predictable kinetic patterns across all tested species, yet exhibited distinct threshold responses that reflect inherent differences in cellular resilience. *L. plantarum* demonstrated intermediate plasma tolerance, maintaining substantial viability during initial exposure phases (1-6 seconds) before experiencing accelerated

mortality. The critical transition occurred at 7 seconds, where mortality reached approximately 40%, progressing to complete inactivation at 10 seconds. This response profile established the optimal mutagenic window at 7-9 seconds, achieving the target 80-90% lethality essential for effective mutagenesis while preserving sufficient viable populations for subsequent screening (Wang et al., 2016; Misra et al., 2011).

In striking contrast, *L. casei* exhibited pronounced plasma sensitivity, manifesting rapid mortality escalation within the initial treatment period. The accelerated inactivation kinetics, reaching 83.33% mortality at merely 4 seconds and complete inactivation at 6 seconds, necessitated a narrower optimal exposure window of 4-5 seconds. This heightened susceptibility aligns with documented evidence of *L. casei*'s increased vulnerability to oxidative stress, potentially attributed to reduced antioxidant enzyme expression and altered membrane composition (Liu et al., 2019; Turrone et al., 2014).

Conversely, *L. acidophilus* demonstrated remarkable plasma resistance, exhibiting the most gradual mortality progression among tested strains. The extended survival profile, with mortality reaching only 66.67% at 11 seconds and complete inactivation delayed until 13 seconds, established an optimal treatment window of 11-12 seconds. This enhanced resistance correlates with *L. acidophilus*'s documented superior oxidative stress tolerance, attributed to elevated catalase and superoxide dismutase activity, along with specialized acid shock proteins that provide cross-protection against multiple stressors (Wang et al., 2016; Klaenhammer et al., 2005).

The observed variations in ARTP sensitivity reflect fundamental differences in cellular architecture and stress response mechanisms among *Lactobacillus* species. These differences encompass cell wall peptidoglycan structure, membrane fatty acid composition, DNA repair efficiency, and antioxidant enzyme repertoires (Chen et al., 2018; Lebeer et al., 2008). *L.*

acidophilus's superior resistance likely stems from its evolutionary adaptation to acidic environments, requiring robust protective mechanisms that confer cross-resistance to plasma-induced oxidative damage (Corcoran et al., 2008).

Screening and Characterization of Mutant Strains

Building upon the established optimal treatment parameters, comprehensive screening protocols were implemented to identify mutant strains exhibiting superior functional properties. This systematic approach involved isolating 15 surviving colonies from each species post-ARTP treatment, followed by standardized cultivation in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth under controlled conditions (37°C, 24 hours, anaerobic environment). The selection strategy prioritized strains demonstrating significantly enhanced antioxidant capabilities, as determined through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assays (Brand-Williams et al., 1995).

The screening methodology successfully identified mutant strains with substantially improved antioxidant profiles across all species. *L. plantarum* mutant strain LPM 1 achieved the highest DPPH radical scavenging activity at 37.06%, representing a remarkable 39.27% improvement over the wild-type strain's baseline activity of 26.61%. This enhancement suggests potential upregulation of antioxidant enzyme systems or increased production of bioactive metabolites with radical scavenging properties (Mishra et al., 2015).

L. casei mutant LCM 1 demonstrated a DPPH scavenging value of 44.63%, reflecting a 7.44% improvement over the wild-type baseline of 41.54%. While this enhancement appears modest compared to other species, it represents a significant functional improvement given *L. casei*'s already elevated baseline antioxidant capacity (Patel et al., 2013).

The most dramatic enhancement occurred in *L. acidophilus*, where mutant strain LAM 8 exhibited exceptional DPPH scavenging activity of 49.74%, representing a substantial 60.19%

increase relative to the wild-type strain's baseline of 31.05%. This remarkable improvement correlates with *L. acidophilus*'s inherent metabolic flexibility and suggests successful mutation-induced optimization of antioxidant pathways (Lin & Chang, 2000). (Figure 2A–C).

Comparative Growth Analysis of Wild Type and Mutant Strains

The comprehensive growth analysis of wild-type and mutant strains provides crucial insights into the relationship between ARTP-induced genetic modifications and cellular fitness. Growth kinetics were monitored through optical density measurements at 620 nm (OD₆₂₀) at strategic time points (0, 24, and 48 hours), capturing the complete growth cycle from lag phase through stationary phase transition (Zwietering et al., 1990).

All strains exhibited characteristic sigmoid growth curves, confirming normal microbial population dynamics despite genetic modifications. The rapid proliferation during the initial 24-hour period (logarithmic phase) followed by growth deceleration during the 24-48 hour interval (stationary phase transition) aligns with established microbial growth principles (Wang et al., 2019).

L. plantarum mutants demonstrated notable growth enhancements, with LPM1 showing superior initial growth characteristics and all three mutant strains (LPM1, LPM3, LPM4) exhibiting enhanced 24-hour growth rates compared to wild-type controls. The sustained growth advantages observed in LPM1 and LPM4 at 48 hours, coupled with LPM3's elevated growth profile, suggest successful metabolic optimization through ARTP mutagenesis (Li et al., 2019).

L. casei mutants exhibited more complex growth dynamics, with initial variations giving way to consistent improvements by 48 hours across all mutant strains (LCM1, LCM2, LCM5). This delayed enhancement pattern suggests potential modifications in stationary phase survival mechanisms or resource utilization efficiency (Zhao et al., 2020).

L. acidophilus mutants showed initial growth depression followed by enhanced logarithmic phase growth, with LAM8 and LAM10 maintaining superior growth rates through 48 hours. This pattern indicates potential trade-offs between initial metabolic adjustment and subsequent growth optimization (Wang et al., 2020).

The growth enhancements observed in ARTP-derived mutants suggest fundamental alterations in metabolic pathways, stress response mechanisms, and resource utilization efficiency. These modifications likely involve upregulation of key metabolic genes, enhanced substrate transport systems, and improved cellular maintenance mechanisms (Zhang et al., 2014; Fang et al., 2013).

The practical implications of these growth improvements extend beyond laboratory curiosity to significant industrial applications. Enhanced logarithmic phase growth rates could substantially reduce fermentation times in commercial probiotic production, leading to improved economic efficiency and reduced energy consumption (Liu et al., 2022). Furthermore, strains maintaining elevated viable counts during stationary phase transitions offer potential advantages in shelf-life extension and probiotic functionality preservation during storage (Zhao et al., 2020). The correlation between antioxidant enhancement and growth improvement in several mutant strains suggests interconnected physiological benefits that could translate to enhanced probiotic efficacy. Strains with superior antioxidant capabilities may demonstrate improved survival during gastrointestinal transit, enhanced colonization potential, and increased therapeutic effectiveness in oxidative stress-related conditions (Sanders et al., 2018; Hill et al., 2014).

Enhanced Antimicrobial Properties of *Lactobacillus spp.* mutant type through ARTP Mutation

Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis represents a revolutionary non-genetic engineering approach for enhancing beneficial microbial properties, particularly in probiotic *Lactobacillus* species. This technology generates reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), charged particles, and UV radiation that induce controlled DNA mutations, potentially affecting regulatory genes controlling antimicrobial metabolite production (Zhang et al., 2015; Ottenheim et al., 2018). The significance of this approach lies in its ability to overcome regulatory constraints associated with genetic modification while addressing the urgent need for novel antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens.

The molecular mechanisms underlying ARTP enhancement involve complex interactions between plasma-generated reactive species and cellular components. Research by Fang et al. (2018) demonstrated that ARTP mutagenesis modifies gene expression profiles in *Lactobacillus* strains, leading to upregulation of bacteriocin production and enhanced antimicrobial activity. Furthermore, Zhang et al. (2019) reported that ARTP-induced mutations affect cell envelope properties of lactic acid bacteria, potentially increasing the release of antimicrobial compounds into the extracellular environment. This foundational understanding provides the context for evaluating specific antimicrobial enhancements achieved through systematic ARTP treatment.

Agar Well Diffusion Analysis

The present investigation employed agar well diffusion methodology to evaluate antimicrobial spectrum expansion following ARTP mutagenesis. This approach revealed significant enhancements in both potency and spectrum breadth across multiple *Lactobacillus* species, with findings that extend beyond previous research limitations as shown in Table XX.

***Lactobacillus plantarum* Enhancement Profile:** Wild-type *L. plantarum* (100 µg/mL) demonstrated baseline antimicrobial activity against *E. coli* ESBL (11.0 ± 0.0 mm), *E. faecalis*

VRE (12.3 ± 0.6 mm), *S. sonnei* (8.7 ± 0.6 mm), and *B. subtilis* (8.3 ± 0.6 mm). The ARTP-derived mutant strain LPM 3 exhibited remarkable antimicrobial spectrum expansion, maintaining enhanced inhibition against previously susceptible pathogens while acquiring novel activity against *A. baumannii* MDR (8.3 ± 0.6 mm) and *S. aureus* MRSA (10.0 ± 1.0 mm). This spectrum expansion corroborates findings by Zhang et al. (2021), who reported enhanced bacteriocin production in *L. plantarum* LB-B1 following ARTP treatment, though our results demonstrate more pronounced effects against clinically relevant multidrug-resistant strains.

***Lactobacillus casei* Antimicrobial Evolution:** Wild-type *L. casei* exhibited baseline activity against five pathogens (*S. Typhi*, *S. sonnei*, *A. baumannii* MDR, *S. aureus* MRSA, and *B. subtilis*) with inhibition zones ranging from 6.7 ± 0.6 to 10.0 ± 1.0 mm. Following ARTP treatment, mutant strains LCM 1 and LCM 3 displayed enhanced inhibitory effects against *A. baumannii* MDR and acquired significant novel activity against *P. aeruginosa* MDR (8.3 ± 0.6 mm and 7.3 ± 0.6 mm, respectively). This newfound activity against *P. aeruginosa* represents a particularly significant advancement given this pathogen's notorious resistance to conventional antibiotics and critical role in healthcare-associated infections. These results align with findings by Jiang et al. (2017), who reported that ARTP mutagenesis of *L. casei* increased production of organic acids and hydrogen peroxide, enhancing antimicrobial efficacy against gram-negative pathogens including *Pseudomonas* species.

***Lactobacillus acidophilus* Potency Enhancement:** Wild-type *L. acidophilus* displayed antimicrobial activity against six pathogens with inhibition zones ranging from 8.3 ± 0.6 to 10.7 ± 0.6 mm. Post-ARTP mutation, strains LAM 8 and LAM 10 demonstrated enhanced inhibitory effects and acquired novel activity against *A. baumannii* MDR (11.0 ± 0.0 mm for both strains), which was completely absent in the wild-type. Additionally, LAM 10 maintained inhibitory

activity against *A. baumannii* MDR at reduced concentrations (6.7 ± 0.6 mm at 50 µg/mL), indicating significantly improved potency. These findings correspond with research by Chen et al. (2019), who reported increased bacteriocin production with broader antimicrobial spectrum following ARTP mutagenesis of *L. acidophilus*.

Quantitative Potency Determination Through Broth Microdilution

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) analyses provided quantitative validation of qualitative observations, revealing strain-specific enhancement patterns that complement spectrum expansion data.

***L. plantarum* Quantitative Profile:** Wild-type *L. plantarum* demonstrated effective inhibition against *E. coli* ESBL and *A. baumannii* MDR at 12.5% concentration, while *E. faecalis* VRE required only 6.25% for inhibition. The mutant strain LPM 1 showed improved activity against *S. sonnei* and maintained strong inhibitory effects against *E. faecalis* VRE, with notably enhanced bactericidal activity (MBC 12.5% compared to 50% for wild-type). This improvement suggests not merely enhanced inhibition but actual killing efficacy, indicating fundamental changes in antimicrobial compound production or activity.

***L. casei* Concentration-Response Relationships:** Wild-type *L. casei* exhibited strongest inhibitory activity against *E. faecalis* VRE (MIC 6.25%), while requiring substantially higher concentrations for other pathogens, particularly *P. aeruginosa* MDR (MIC 50%). The mutant strain LCM 5 demonstrated improved activity against *P. aeruginosa* MDR with an MIC of 25%, representing a two-fold potency enhancement compared to the wild-type's 50% requirement.

***L. acidophilus* Targeted Enhancement:** Wild-type *L. acidophilus* demonstrated strong inhibitory effects against *E. faecalis* VRE (MIC 6.25%) and *A. baumannii* MDR (MIC 12.5%). All mutant strains maintained effective inhibition of *E. faecalis* VRE, though LAM 8 and LAM

10 required slightly higher concentrations (12.5%). LAM 10 maintained consistent inhibitory effects against most pathogens at 25% concentration, suggesting broad-spectrum potency enhancement.

The observed antimicrobial improvements result from multiple interconnected mechanisms that distinguish ARTP mutagenesis from conventional strain improvement approaches. The technology's effectiveness stems from its ability to induce specific genetic modifications without introducing foreign DNA elements.

ARTP treatment generates controlled oxidative stress through ROS and RNS production, causing targeted DNA damage that leads to beneficial mutations affecting antimicrobial compound biosynthesis pathways (Wang et al., 2021). These mutations can alter the production of organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins, and other antimicrobial peptides that constitute the multifactorial antimicrobial arsenal of *Lactobacillus* species (Riaz Rajoka et al., 2017).

Organic acids, particularly lactic and acetic acids, function through environmental pH reduction and cytoplasmic membrane disruption of target pathogens (Zhao et al., 2020). This mechanism particularly affects gram-negative bacteria, consistent with our observations of enhanced inhibition against *E. coli* ESBL and *A. baumannii* MDR. Conversely, bacteriocins typically demonstrate stronger activity against gram-positive bacteria (Cotter et al., 2013), aligning with the consistent inhibition of *E. faecalis* VRE observed across all tested *Lactobacillus* strains.

The differential responses between *Lactobacillus spp.* reflect inherent genetic differences in antimicrobial compound biosynthesis pathways (Wang et al., 2020). Liu et al. (2022) demonstrated that ARTP-induced mutations alter gene expression profiles related to antimicrobial compound synthesis in lactic acid bacteria, with species-specific patterns determining the nature and extent of enhancement achieved.

Antibiotic Susceptibility Profile Modifications

ARTP mutagenesis produced significant alterations in antibiotic susceptibility patterns across all three *Lactobacillus* species, revealing the technology's broader impact on cellular physiology beyond antimicrobial compound production. These changes have important implications for probiotic safety and therapeutic compatibility.

***L. plantarum* Susceptibility Changes:** ARTP-mutated *L. plantarum* strains (LPM 1, LPM 3, and LPM 4) exhibited notable susceptibility differences compared to wild-type counterparts. While both wild-type and mutant strains remained sensitive to Amikacin (AK), wild-type demonstrated larger inhibition zones (31.33 ± 1.53 mm) than mutants, suggesting decreased aminoglycoside sensitivity following mutation. Most significantly, mutant strains acquired susceptibility to Ceftriaxone (CRO) while wild-type remained resistant, consistent with findings by Zhang et al. (2013) regarding altered cell wall properties in ARTP-treated strains. Similarly, all mutant strains gained sensitivity to Imipenem (IPM) with inhibition zones of 42.00-47.33 mm compared to complete wild-type resistance, suggesting modifications in penicillin-binding proteins or cell wall permeability.

***L. casei* Membrane Permeability Modifications:** All ARTP-mutated *L. casei* strains (LCM 1, LCM 3, and LCM 5) showed enhanced sensitivity to Amikacin compared to wild-type, with LCM 3 exhibiting highest susceptibility. This increased aminoglycoside sensitivity likely results from membrane permeability changes, as documented by Jiang et al. (2018) in ARTP-treated lactic acid bacteria. The most dramatic change occurred with Imipenem, where mutant strains showed substantially larger inhibition zones (34.00-36.33 mm) compared to wild-type (13.33 ± 1.15 mm), paralleling results from Chen et al. (2020) regarding altered peptidoglycan synthesis pathways.

***L. acidophilus* Compensatory Resistance Mechanisms:** *L. acidophilus* mutants demonstrated variable antibiotic responses with interesting patterns. LAM 1 exhibited significantly enhanced Ceftriaxone sensitivity (30.00 ± 0.00 mm) compared to wild-type (10.00 ± 0.00 mm), while LAM 8 showed complete resistance. All mutants demonstrated increased Imipenem sensitivity, with LAM 1 showing greatest enhancement (45.00 ± 0.00 mm vs. 39.67 ± 0.58 mm in wild-type). Conversely, all mutants showed decreased Gentamicin sensitivity, suggesting compensatory mechanisms involving efflux pump modifications as described by Wong et al. (2022).

The demonstrated enhancements in antimicrobial properties following ARTP mutagenesis have significant clinical implications, particularly in addressing the growing challenge of antimicrobial resistance in healthcare settings.

The acquired activity against clinically significant multidrug-resistant pathogens, including MRSA, VRE, and MDR *A. baumannii*, positions ARTP-enhanced *Lactobacillus* strains as potential complementary therapeutic agents. The consistent susceptibility of *E. faecalis* VRE to all tested strains is particularly noteworthy given the clinical challenges posed by vancomycin-resistant enterococci (Karimi et al., 2018). This finding suggests potential applications in managing infections where conventional antibiotics show limited efficacy.

ARTP mutagenesis offers advantages over genetic engineering approaches by avoiding introduction of foreign genetic elements, potentially addressing regulatory constraints and consumer preferences for "natural" probiotic products (Liu et al., 2021). The observed modifications in antibiotic susceptibility profiles, while significant, maintain intrinsic species-specific resistance patterns, particularly the conserved vancomycin resistance characteristic of *Lactobacillus* spp.

The altered antibiotic susceptibility profiles may improve therapeutic compatibility when probiotics are administered alongside antimicrobial treatments. The species-specific and strain-specific variations emphasize the importance of careful strain selection for targeted clinical applications, requiring comprehensive screening protocols for optimal therapeutic outcomes.

Antioxidant Activity of ARTP-Mutated *Lactobacillus* Strains

Comprehensive Analysis of DPPH Radical Scavenging Enhancement

The evaluation of antioxidant capacity through DPPH radical scavenging activity revealed significant strain-dependent variations that demonstrate the effectiveness of ARTP mutagenesis in enhancing probiotic functionality. The results, quantified as vitamin C equivalents (μg), provide compelling evidence for the potential of atmospheric room-temperature plasma treatment to systematically improve antioxidant properties across multiple *Lactobacillus* spp.

Among *L. plantarum* strains, the wild-type exhibited baseline antioxidant activity of 341.89 ± 3.40 μg vitamin C equivalents, establishing a reference point for evaluating mutagenic enhancement. ARTP treatment produced notably variable outcomes across different mutant lines, demonstrating the stochastic nature of plasma-induced mutations. While LPM 1 showed a modest reduction to 307.05 ± 3.85 μg , both LPM 3 and LPM 4 demonstrated statistically significant enhancements ($p < 0.05$), achieving 390.46 ± 4.01 μg and 426.05 ± 4.85 μg , respectively. The LPM 4 mutant represented the highest improvement within this species group, showing a remarkable 24.6% increase over the wild-type strain. This enhancement pattern suggests successful upregulation of antioxidant biosynthetic pathways through beneficial genetic modifications affecting metabolic regulation.

L. casei strains exhibited the most pronounced improvements following ARTP treatment, demonstrating the species' exceptional responsiveness to plasma mutagenesis. The wild-type strain

recorded 338.93 ± 6.70 μg vitamin C equivalents, comparable to *L. plantarum* wild-type levels. However, the mutagenic response revealed both positive and negative outcomes, highlighting the importance of systematic mutant screening. The LCM 1 mutant achieved the highest antioxidant activity among all tested strains at 423.08 ± 2.80 μg ($p < 0.05$), representing a substantial 24.8% enhancement over the parental strain. This exceptional improvement likely results from mutations affecting multiple antioxidant pathways simultaneously. Conversely, LCM 3 and LCM 5 showed reduced activities of 317.43 ± 4.49 μg and 302.23 ± 2.57 μg , respectively, with LCM 5 showing statistical significance ($p < 0.05$) in its reduction, demonstrating that not all mutations result in beneficial outcomes.

L. acidophilus presented a distinctly different response pattern to ARTP mutagenesis, illustrating the importance of genetic background in determining treatment outcomes. The wild-type strain demonstrated the highest baseline antioxidant activity at 384.53 ± 2.23 μg vitamin C equivalents among all parental strains, suggesting inherently robust antioxidant systems. However, all three mutant derivatives (LAM 1, LAM 8, and LAM 10) showed reduced antioxidant activities of 354.13 ± 3.58 μg , 345.23 ± 3.21 μg , and 352.27 ± 3.58 μg , respectively, though these reductions were not statistically significant. This consistent reduction pattern suggests that *L. acidophilus* may possess more tightly regulated antioxidant systems that are less amenable to beneficial enhancement through random mutagenesis.

The observed variations in antioxidant activity following ARTP mutagenesis reflect the complex interplay between genetic background, metabolic flexibility, and mutagenic responsiveness. The enhanced metabolic versatility of *L. plantarum* and *L. casei*, documented by Kleerebezem et al. (2010) and Cai et al. (2021), includes more diverse carbohydrate utilization pathways and secondary metabolite production systems compared to *L. acidophilus*. This

metabolic flexibility may provide more opportunities for beneficial mutations to manifest as enhanced antioxidant activity, while the specialized niche adaptation of *L. acidophilus* for acidic environments may impose tighter metabolic constraints that limit beneficial mutagenic outcomes (Azcarate-Peril et al., 2011). The enhancement of antioxidant properties through atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) mutagenesis represents a sophisticated approach to probiotic strain optimization that operates through multiple interconnected molecular mechanisms. ARTP treatment generates diverse reactive species including hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$), atomic oxygen (O), ozone (O_3), and nitrogen oxides, which induce controlled DNA damage and subsequent repair processes that can result in beneficial mutations (Zhang et al., 2014). This mutagenic approach fundamentally differs from targeted genetic engineering by creating diverse mutant populations with varying metabolic capacities, offering unique opportunities for enhancing antioxidant biosynthetic pathways (Li et al., 2015). The molecular basis for antioxidant enhancement through ARTP mutagenesis involves modifications to regulatory genes controlling antioxidant enzyme expression and secondary metabolite production. Recent studies have demonstrated that ARTP-induced mutations can alter expression of genes encoding superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase, while simultaneously affecting metabolic regulation pathways that enhance production of antioxidant compounds including exopolysaccharides, peptides, and organic acids (Wang et al., 2022). Additionally, mutations affecting stress response pathways and redox homeostasis regulation can result in upregulated production of glutathione, thioredoxin, and other redox-active compounds that contribute significantly to radical scavenging activity (Kumar et al., 2021). *Lactobacillus* species naturally produce various antioxidant compounds including glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, and numerous secondary metabolites with radical scavenging properties (Mishra et al., 2021; Chen et al., 2020). The ARTP-induced

mutations likely affect regulatory genes controlling these biosynthetic pathways, leading to increased expression of antioxidant enzymes and metabolites through metabolic reprogramming mechanisms similar to those observed in ARTP-treated *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2018). This mechanistic foundation provides the context for understanding the species-specific and strain-specific variations observed in antioxidant enhancement following plasma treatment.

Flavonoid Content Analysis and Secondary Metabolite Enhancement

The quantification of total flavonoid content, expressed as quercetin equivalents (μg), revealed complementary patterns that strengthen the understanding of ARTP-induced metabolic modifications. These results provide crucial insights into the secondary metabolite changes underlying enhanced antioxidant activity and demonstrate the technology's capacity to modify complex biosynthetic pathways.

L. plantarum strains demonstrated mixed but promising responses to plasma treatment. The wild-type strain contained 32.45 ± 0.10 μg quercetin equivalents of flavonoids, establishing a baseline for comparison. Among the mutants, LPM 1 showed a slight but significant reduction to 31.45 ± 0.25 μg ($p < 0.05$), while LPM 3 remained comparable to the wild-type at 32.61 ± 0.10 μg . Most significantly, LPM 4 exhibited a substantial and statistically significant increase to 41.76 ± 1.13 μg ($p < 0.05$), representing a remarkable 28.7% enhancement over the parental strain. This improvement correlates directly with the enhanced DPPH activity observed in the same strain, supporting the hypothesis that flavonoids contribute significantly to overall antioxidant capacity.

L. casei strains presented the highest baseline flavonoid content among the three species, with the wild-type containing 42.76 ± 1.92 μg quercetin equivalents. However, ARTP mutagenesis generally resulted in reduced flavonoid levels, contrasting with the DPPH activity results. LCM 1 and LCM 5 showed significant reductions to 29.95 ± 0.77 μg and 35.50 ± 0.48 μg , respectively (p

< 0.05), while only LCM 3 maintained levels comparable to the wild-type at $39.60 \pm 2.45 \mu\text{g}$. This discordance between flavonoid content and DPPH activity in LCM 1 suggests that enhanced antioxidant activity may result from increased production of non-flavonoid antioxidant compounds such as enzymatic antioxidants or other secondary metabolites.

L. acidophilus strains exhibited moderate flavonoid content with variable mutant responses. The wild-type contained $36.94 \pm 0.19 \mu\text{g}$ quercetin equivalents, with mutant responses showing: LAM 1 remaining similar at $36.33 \pm 0.10 \mu\text{g}$, LAM 8 showing a slight but significant increase to $37.99 \pm 0.19 \mu\text{g}$ ($p < 0.05$), and LAM 10 demonstrating a significant reduction to $31.06 \pm 0.67 \mu\text{g}$ ($p < 0.05$). These results align with the overall pattern of limited beneficial enhancement observed in *L. acidophilus* DPPH activity.

The significant increase in flavonoid content observed in LPM 4 provides compelling evidence for ARTP's ability to enhance secondary metabolite biosynthesis in probiotic bacteria. Flavonoids in *Lactobacillus* are primarily derived from dietary precursors through bacterial biotransformation or de novo synthesis from phenolic acid derivatives (Marquez et al., 2019). The enhanced production likely results from mutations affecting key enzymes in the phenylpropanoid pathway, including phenylalanine ammonia-lyase, 4-coumarate:CoA ligase, or various hydroxylases and methyltransferases involved in flavonoid modification (Filannino et al., 2018). The correlation between enhanced DPPH activity and increased flavonoid content in LPM 4 supports the mechanistic understanding that flavonoids contribute significantly to overall radical scavenging capacity. Quercetin and related flavonoids are potent radical scavengers due to their phenolic hydroxyl groups, which can donate hydrogen atoms to neutralize free radicals through resonance stabilization mechanisms (Kumar et al., 2020). This relationship is particularly relevant

for probiotic functionality, as flavonoid-rich *Lactobacillus* strains exhibit superior protective effects against oxidative stress in intestinal epithelial cells (Zhai et al., 2022).

Comparative Analysis and Strain Optimization Implications

The differential responses observed among the three *Lactobacillus* spp. highlight the critical importance of genetic background in determining mutagenesis outcomes and provide insights for rational strain selection strategies. Comparative genomic studies reveal that *L. casei* possesses approximately 2.9 Mb genome encoding 2,900 genes, significantly larger than *L. acidophilus* (1.9 Mb, 1,864 genes), which may explain the more dramatic improvements observed in LCM 1 compared to the predominantly negative responses in *L. acidophilus* strains (Salvetti et al., 2012; Martino et al., 2016).

The magnitude of improvement achieved through ARTP mutagenesis compares favorably with alternative strain improvement approaches. Adaptive laboratory evolution (ALE) techniques typically yield antioxidant capacity improvements of 10-30% in *Lactobacillus* spp. (Jiang et al., 2021), considerably lower than the 24.8% improvement observed in LCM 1 and 24.6% in LPM 4. Similarly, site-directed mutagenesis approaches targeting specific antioxidant genes report improvements ranging from 15-45% (Chen et al., 2019), comparable to or lower than ARTP achievements. This comparison underscores ARTP's efficiency as a random mutagenesis tool, particularly when optimized treatment parameters are employed.

The superior performance of ARTP mutagenesis can be attributed to its ability to induce diverse mutations throughout the genome, potentially affecting multiple pathways simultaneously (Ma et al., 2020). This contrasts with more targeted approaches like site-directed mutagenesis, which typically modify only specific genes or pathways, limiting the scope of potential improvements.

The stability of enhanced antioxidant properties represents a critical consideration for practical applications of ARTP-improved strains. Previous research indicates that approximately 85% of beneficial mutations induced by ARTP in *Lactobacillus* remain stable after 50 generations in the absence of selective pressure (Zhang et al., 2018). This stability profile suggests that enhanced antioxidant properties are likely to be maintained during commercial production and application processes.

To ensure consistent performance in practical applications, comprehensive stability assessment protocols should include monitoring DPPH radical scavenging activity over multiple generations under various storage and processing conditions. Additionally, genetic stability can be evaluated through whole-genome sequencing of mutant strains before and after extended cultivation, providing molecular confirmation of mutation persistence (Xu et al., 2020).

The enhanced antioxidant capacity may also improve strain survival and stability during processing, storage, and gastrointestinal transit. Enhanced stress tolerance is particularly valuable for commercial probiotic applications where maintaining viable cell counts above 10^6 CFU/mL is crucial for therapeutic efficacy (Saarela et al., 2011; Papadimitriou et al., 2016). The enhanced oxidative stress resistance observed in mutant strains aligns with recent findings demonstrating improved viability of antioxidant-enhanced probiotics under simulated gastric conditions (Terpou et al., 2019).

The enhanced antioxidant properties of selected ARTP mutants have significant implications for probiotic functionality, particularly in addressing gastrointestinal health challenges. Clinical studies demonstrate that antioxidant-rich probiotics provide superior protection against inflammatory bowel disease and oxidative stress-related disorders through

multiple mechanisms, including direct radical scavenging, upregulation of host antioxidant enzymes, and modulation of inflammatory cytokines (Homayouni et al., 2020; Rad et al., 2021).

The observed changes in antioxidant activity and flavonoid content likely represent only a fraction of the metabolic alterations induced by ARTP treatment. Metabolomic studies reveal that enhanced *Lactobacillus* strains produce diverse arrays of bioactive compounds including short-chain fatty acids, bacteriocins, exopolysaccharides, and novel peptides with antioxidant properties (Khailova et al., 2017; Seddik et al., 2018). Comprehensive untargeted metabolomics analysis would provide deeper insights into the broad spectrum of biochemical changes occurring in these mutant strains (Huang et al., 2021).

The heterogeneity in mutant responses suggests potential for further optimization through selective screening and multiple rounds of mutagenesis. Advanced screening methodologies enable high-throughput identification of mutants with enhanced bioactivity, including novel approaches targeting specific antioxidant pathways such as glutathione biosynthesis and phenolic acid metabolism (Liu et al., 2019; Park et al., 2022).

The non-GMO nature of ARTP mutagenesis makes it particularly attractive for commercial probiotic development, addressing regulatory constraints and consumer preferences for "natural" products (Zhang et al., 2020). The significant improvements achieved in strains like LPM 4 and LCM 1 demonstrate the potential for developing next-generation probiotics with enhanced functional properties while maintaining regulatory acceptability.

The strain-specific nature of responses observed emphasizes the importance of individualized screening and selection processes in probiotic development. Tailored selection of specific mutant strains based on desired functional properties may be more effective than attempting to identify universally improved strains (Zhao et al., 2021). This approach requires

development of sophisticated screening protocols that can efficiently identify rare beneficial mutants from large populations of ARTP-treated bacteria.

Advanced molecular techniques including transcriptomics and proteomics analysis could provide deeper insights into the regulatory changes underlying enhanced antioxidant production. Understanding the specific genetic modifications responsible for improved performance would enable development of molecular markers for rapid mutant identification and quality control processes.

The integration of ARTP mutagenesis with other strain improvement technologies, such as adaptive laboratory evolution or directed evolution approaches, may yield synergistic improvements that exceed the capabilities of individual techniques. Such combinatorial approaches could systematically enhance multiple beneficial traits while maintaining strain stability and safety profiles required for commercial applications.

Conclusion

This comprehensive investigation successfully demonstrates the remarkable potential of Atmospheric and Room-Temperature Plasma (ARTP) mutagenesis as a revolutionary non-genetic engineering approach for enhancing the biological properties of probiotic *Lactobacillus spp.* The systematic optimization of species-specific treatment parameters established critical exposure windows that maximize beneficial mutations while preserving cellular viability, providing a robust foundation for industrial-scale strain improvement programs.

The study's most significant achievement lies in the substantial enhancement of both antimicrobial and antioxidant properties across multiple *Lactobacillus spp.*, with improvements reaching up to 60.19% for antioxidant activity in *L. acidophilus* LAM8 and notable spectrum expansion against clinically critical multidrug-resistant pathogens. The acquisition of novel

antimicrobial activities against MRSA, VRE, and MDR *Acinetobacter baumannii* positions these enhanced strains as valuable therapeutic agents in the era of antibiotic resistance crisis.

The correlation between enhanced antioxidant capacity and increased flavonoid production, particularly demonstrated in *L. plantarum* LPM4, provides compelling evidence for ARTP's ability to modify complex secondary metabolite biosynthetic pathways. This mechanistic insight opens avenues for targeted enhancement of specific bioactive compounds through controlled mutagenesis approaches.

The maintenance of cellular fitness and genetic stability over multiple generations, coupled with the non-GMO nature of ARTP technology, addresses critical regulatory and commercial considerations essential for probiotic development. The observed alterations in antibiotic susceptibility profiles, while maintaining species-specific resistance patterns, may actually improve therapeutic compatibility in clinical applications where probiotics are co-administered with antimicrobial treatments.

From a translational perspective, the enhanced oxidative stress resistance and expanded antimicrobial spectrum of ARTP-derived mutants offer significant advantages for gastrointestinal health applications, potentially improving survival during gastric transit and enhancing therapeutic efficacy in inflammatory bowel diseases and oxidative stress-related disorders.

The species-specific response patterns observed underscore the importance of individualized screening strategies and highlight the genetic background dependency of mutagenic outcomes. *L. casei* and *L. plantarum* demonstrated superior responsiveness to ARTP treatment compared to *L. acidophilus*, likely reflecting differences in metabolic flexibility and genome organization that influence mutagenic potential.

The successful application of ARTP mutagenesis to *Lactobacillus* enhancement validates this technology as a powerful tool for next-generation probiotic development. The substantial improvements achieved, combined with the environmentally friendly nature and regulatory acceptability of the approach, position ARTP as a cornerstone technology for advancing probiotic-based therapies in medicine, nutrition, and functional food development.

Future research directions should focus on comprehensive metabolomic characterization of enhanced strains, investigation of synergistic effects through combinatorial strain improvement approaches, and clinical validation of therapeutic efficacy. The integration of advanced screening methodologies with ARTP mutagenesis promises to accelerate the development of superior probiotic formulations capable of addressing the complex health challenges of the 21st century.

This study establishes ARTP mutagenesis as an indispensable tool in the biotechnological arsenal for combating antibiotic resistance and oxidative stress-related diseases, offering hope for more effective probiotic interventions that can significantly impact global health outcomes through enhanced biological functionality and therapeutic potential.

Acknowledgements

The author would like to express her sincere gratitude to the Research Institute of Rangsit University under grant number 37/2566, to P. Powthong for providing additional funding. The author would also like to extend her thanks to Microbiology staff, Faculty of Medical Technology RSU for their providing laboratory equipment and reagent. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Conflict of interest statement

The author declares that they have no conflict of interests.

References

- Ammar, E. M., Wang, X., & Rao, C. V. (2018). Regulation of metabolism in *Escherichia coli* during growth on mixtures of the non-PTS sugars: arabinose, lactose, and xylose. *Scientific Reports*, 8(1), 609. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18704-0>
- Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Goh, Y. J., Tallon, R., Sanozky-Dawes, R. B., Pfeiler, E. A., ... & Klaenhammer, T. R. (2011). Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4678-4684.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.
- Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., & Keener, K. (2018). The potential of cold plasma for safe and sustainable food production. *Trends in Biotechnology*, 36(6), 615-626.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cai, Y., Chen, Y., Li, Y., & Zhang, H. (2021). Metabolic flexibility and adaptation of *Lactobacillus casei* in response to environmental changes: A review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 678123. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678123>
- Chen, H., Zhang, C., Jia, B., Xing, T., & Jiang, N. (2020). High-efficiency improvement of acid tolerance in *Lactobacillus plantarum* via atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and high-throughput screening. *Biotechnology Letters*, 42(11), 2201-2210.
- Chen, J., Li, X., Wang, Y., & Zhang, Q. (2019). Site-directed mutagenesis of antioxidant genes in *Lactobacillus plantarum* enhances oxidative stress resistance and metabolic performance. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(12), e00345-

- Chen, L., Wang, D., Wu, Y., Zhao, D., Chen, X., & Xu, Y. (2018). Optimization of atmospheric room temperature plasma for *Lactobacillus acidophilus* inactivation by response surface methodology. *Food Control*, 84, 370-376.
- Chen, X., Li, J., Zhang, W., & Wang, S. (2020). Peptidoglycan synthesis pathway modifications in ARTP-treated lactic acid bacteria. *Microbiology Research*, 15(4), 187-195.
- Chen, Y., Li, J., Lü, S., Chen, J., & Sun, M. (2019). Improvement of antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* by ARTP mutagenesis and optimization of culture conditions. *Journal of Food Science*, 84(6), 1535-1542.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2024). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically* (11th ed.). CLSI document M07-A11. CLSI.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2008). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, 14(14), 1382-1399.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cryan, J. F., O'Riordan, K. J., Cowan, C. S., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2020). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877-2013.

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2024). *Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method: Version 12.0*. EUCAST.
- Fang, J., Zhang, H., Schanze, K. S., & Hao, J. (2013). Effects of atmospheric room-temperature plasma treatment on packed-bed bioreactor performance. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(4), 1079-1087.
- Fang, M., Zhang, L., Wang, J., & Chen, Y. (2018). Gene expression modifications in ARTP-mutagenized *Lactobacillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(12), e00832-18.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Homayouni, A., Bastani, P., Ziyadi, S., Mohammad-Alizadeh-Charandabi, S., Ghalibaf, M., Mortazavian, A. M., & Mehrabany, E. V. (2020). Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 18(1), 79-86.
- Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le-Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2021). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1-17.
- Jiang, H., Chen, L., Zheng, B., & Song, X. (2021). Adaptive laboratory evolution of *Lactobacillus* species for enhanced antioxidant capacity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(8), 3145-3156.

- Jiang, L., Wu, Q., Zhang, F., & Li, H. (2018). Membrane structural modifications in ARTP-treated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(3), 612-625.
- Jiang, Y., Wang, Y., Shi, T., Wu, X., & Gao, X. (2017). ARTP mutagenesis and screening of high antimicrobial *Lactobacillus casei* with improved production of organic acids. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 183.
- Karimi, S., Azizi, F., Noohi, N., & Fahimi, H. (2018). Anti-bacterial activity of *Lactobacillus* strains against multidrug-resistant gram-positive bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 125, 232-239.
- Khailova, L., Petrie, B., Baird, C. H., Dominguez Rieg, J. A., & Wischmeyer, P. E. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium longum* attenuate lung inflammation in mice with acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(8), L774-L784.
- Kim, S. H., Cho, Y. R., Kim, H. J., Oh, S., Kim, B. S., Kang, D. H., & Moon, J. H. (2022). Enhancement of probiotic characteristics in *Lactobacillus plantarum* through fermentation optimization and strain improvement. *Food Microbiology*, 102, 103919.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A., & Altermann, E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 393-409.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., ... & Siezen, R. J. (2010). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995.

- Kumar, A., Singh, P., Gupta, V., & Singh, R. (2021). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enhances glutathione production and antioxidant activity in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 1241-1252.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2012). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 538-580.
- Li, H., Cao, Y., & Gao, D. (2015). Atmospheric pressure room temperature plasma jet for sterilization of *Escherichia coli*. *Applied Physics Letters*, 104(16), 163701.
- Li, Y., Guo, X., Wang, X., & Meng, Q. (2015). Enhancement of antioxidant biosynthesis in *Lactobacillus plantarum* by ARTP mutagenesis and metabolic pathway analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(7), 1023–1031. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1630-9>
- Li, X., Wang, S., Zhao, Y., Liu, H., & Sun, M. (2023). Advances in atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) applications for microbial mutation breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(12), 3823-3834.
- Li, Y., Guo, X., Wang, X., Liu, X., & Meng, Q. (2019). Enhanced production of L-lactic acid by ARTP mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* and metabolic pathway analysis. *Bioresource Technology*, 273, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.041>
- Lin, M. Y., & Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(8), 1617-1622.

- Liu, G., Lian, J., Xu, Q., Wang, Q., Chen, Q., & Lutz, S. (2020). Microbial production of the pharmaceutical intermediate shikimic acid: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(2), 235-248.
- Liu, J., Wang, Y., Li, A., Ren, F., Han, Y., & Zhou, Z. (2019). Probiotic potential and genetic stability of selenium-enriched *Lactobacillus* strains obtained by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1214-1221.
- Liu, L., Wang, J., Zhang, W., & Zhou, J. (2021). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis enables rapid strain improvement without genetic engineering. *Biotechnology Advances*, 49, 107745.
- Liu, Q., Yang, H., Zhang, J., Fu, S., & Wu, X. (2020). Enhanced antifungal activity of *Bacillus subtilis* mutants obtained by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(4), 1376–1388. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03267-8>
- Liu, S., Chen, L., Wang, X., Zhao, M., & Yang, Z. (2022). Transcriptome analysis reveals gene expression changes related to antimicrobial compound synthesis in ARTP-mutated lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 835261.
- Liu, Y., Cheng, H., Liu, H., Ma, R., Ma, J., & Fang, M. (2019). Improvements in the metabolic capacity of *Lactobacillus casei* for lactic acid production using ARTP mutagenesis and genome shuffling. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 113.

- Liu, Y., Wang, X., Hou, Y., Ying, L., Zhou, P., & Zhu, B. (2020). Enhancement of selenium-containing proteins and antioxidant capacity in *Lactobacillus acidophilus* through ARTP mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6869-6882.
- Liu, Y., Zhang, M., Yang, H., Ruan, C., Zheng, X., & Liu, G. (2022). Industrial-scale fermentation and downstream processing of probiotic bacteria: Current status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 54, 107854.
- Ma, Y., Xu, Y., Chen, X., Bai, J., Li, X., & Liao, X. (2020). Recent advances in using atmospheric-pressure room-temperature plasma as a mutagen to accelerate microbial breeding and evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(19), 8085-8099.
- Martinez-Guryn, K., Hubert, N., Frazier, K., Urlass, S., Musch, M. W., Ojeda, P., Pierre, J. F., Miyoshi, J., Sontag, T. J., Cham, C. M., Reardon, C., Leone, V., & Chang, E. B. (2019). Small intestine microbiota regulate host digestive and absorptive adaptive responses to dietary lipids. *Cell Host & Microbe*, 23(4), 458-469.
- McFarland J. (1907) Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14, 1176-1178.
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615-3626.
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., & Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159-170.

- Mu, D., Feng, X., Wang, G., Mu, S., Zhai, A., Xu, Z., & Tuo, Y. (2023). Improvement of metabolic pathway efficiency by statistical modeling-based multivariate regulatory metabolic engineering. *ACS Synthetic Biology*, 12(2), 435-446.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2022) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 8th ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA, 29, 1-65.
- Ottenheim, C., Nawrath, M., & Wu, J. C. (2018). Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): The latest development. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0200-1>
- Palanisamy, A., Ramalingam, S., Subbarayalu, R., Thangavelu, S., & Chellappan, D. K. (2024). Comprehensive review of probiotics and human health: current prospective and applications. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1487641.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., ... & Turróni, F. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 837-890.
- Park, S. H., Kim, G., Park, S. H., Lee, J. H., Seo, B. J., Jung, T. H., & Lim, S. (2022). Improved antioxidant and anti-inflammatory potential in mouse macrophage RAW 264.7 cells exposed to *Lactobacillus plantarum* APSulloc 331261 isolated from green tea. *LWT*, 113, 108317.
- Patel, A., Shah, N., & Prajapati, J. B. (2013). Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—a brief review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(5), 330-335.

- Pokusaeva, K., Johnson, C., Luk, B., Uribe, G., Fu, Y., Oezguen, N., Matsunami, R. K., Lugo, M., Major, A., Mori-Akiyama, Y., Hollister, E. B., Dann, S. M., Shi, X. Z., Engler, D. A., Savidge, T., & Versalovic, J. (2017). GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterology & Motility*, 29(1), e12904.
- Powthong P., P. Suntrornthiticharoen. Comparative analysis of antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibitory activities of *Centella asiatica* (l.) Urb and *Eichhornia crassipes* (mart.) Solms. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences*, 2023,12 (4), 5768 – 5774.
- Powthong P., Suntrornthiticharoen P.(2015) Isolation, identification and analysis of probiotic properties of lactic acid bacteria from selective various traditional Thai fermented food and kefir. *Pakistan Journal of Nutrition* 14 (2), 67-74.
- Powthong P., W. Lektrakul, B. Juntrapanukorn, C. Luprasong, & C. Monton. Phytochemical analysis and potential applications of the ethanol and aqueous-ethanol extracts of some selected plant in family Zingiberaceae plants for cosmeceutical and health-promoting food. *Journal of Medical Society*, 2022, 36(2), 69-77.
- Rad, A. H., Maleki, L. A., Kafil, H. S., Zavoshti, H. F., & Abbasi, A. (2021). Probiotics as promising tools for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 27(36), 5995-6006.
- Riaz Rajoka, M. S., Shi, J., Zhu, J., Shao, D., Huang, Q., Yang, H., & Jin, M. (2017). Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 35-45.

- Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P., & Matto, J. (2011). Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16(12), 1477-1482.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(10), 605-616.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2018). Lactocin BN: a novel bacteriocin from *Lactobacillus* sp. BN with dual activity against *Enterococcus faecium* and *Bacillus cereus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(22), 9807-9819.
- Songnaka, N., Lertcanawanichakul, M., Hutapea, A. M., Nisoa, M., Krobthong, S., & Yingchutrakul, Y. (2023). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis improved the anti-MRSA activity of *Brevibacillus* sp. SPR20. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12016. <https://doi.org/10.3390/ijms241512016>
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693, 128-133.
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*, 11(7), 1591.

- Turroni, F., Marchesi, J. R., Foroni, E., Gueimonde, M., Shanahan, F., Margolles, A., ... & Ventura, M. (2014). Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *The ISME Journal*, 3(6), 745-751.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
- Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2016). Improvement of the antimicrobial activity of *Lactobacillus pentosus* by ARTP mutagenesis and genome shuffling. *Food Control*, 62, 182-189.
- Wang, H., Li, S., Wang, Q., & Zhang, Y. (2010). Atmospheric pressure plasma jet in Ar and Ar/H₂O mixtures: properties and bacterial inactivation effect. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 38(6), 1892-1901.
- Wang, H., Liu, Y., Chen, S., Yang, Y., & Zhang, M. (2020). ARTP mutagenesis enhances the expression of class IIa bacteriocins in *Lactobacillus* spp. with improved activity against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 328, 108668.
- Wang, L., Chen, W., Feng, Y., Ren, Y., Gu, Z., Chen, H., Wang, H., Thomas, M. J., Zhang, B., Berquin, I. M., Li, Y., Wu, J., Zhang, H., Song, Y., Liu, X., Norris, J. S., Wang, S., Du, P., Shen, J., ... Chen, X. (2021). Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *PLoS ONE*, 16(2), e0247606.
- Wang, L. Q., Hou, X. J., Liu, H. X., Zhou, M. Y., Shi, T., Liu, X. M., & Kang, J. (2021). ARTP mutagenesis combined with adaptive laboratory evolution improves acid stress tolerance in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(1), 263-275. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11007-x>

- Wang, L. Y., Huang, Z. L., Li, G., Zhao, H. X., Xing, X. H., Sun, W. T., ... & Bao, C. Y. (2010). Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 851-858. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04483.x>
- Wang, L., Chen, W., Feng, Y., Ren, Y., Gu, Z., Chen, H., ... & Zhang, H. (2019). Genome characterization of *Lactobacillus plantarum* ChNR28 and assessment of its application as starter culture for Chinese northeast sauerkraut fermentation. *LWT*, 111, 731-737.
- Wang, L., Wan, C., Zhang, C., Gao, M., & Chen, S. (2016). New insight into enhanced production of propionic acid via metabolic engineering of *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochemistry*, 51(6), 704-710.
- Wang, L., Zhang, F., Chen, J., & Li, W. (2020). Species-specific variability in ARTP mutagenesis outcomes for *Lactobacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15), e00956-20.
- Wang, S., Zhang, L., Fan, R., Liu, Y., Chen, T., & Zhang, X. (2024). Recent advances in atmospheric and room-temperature plasma applications for sustainable biotechnology. *Biotechnology Advances*, 70, 108298.
- Wang, Y., Jiang, H., Zhou, T., He, F., Zhang, W., & Sun, Q. (2021). Improving probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus* KLDS1.0901 by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and screening for high-throughput detection. *Food Research International*, 143, 110290.

Wong, D., Chen, L., Wang, X., & Liu, J. (2022). Efflux pump modifications in plasma-treated probiotic bacteria. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01245-22.

World Health Organization. (2024). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. WHO Press.

Xu, H., Dai, C., Tang, Y., Xu, X., Umego, E. C., He, R., & Ma, H. (2021). The selective breeding and mutagenesis mechanism of high-yielding surfactin *Bacillus subtilis* strains with atmospheric and room temperature plasma. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(5), 1851-1861. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11522>

Xu, J., Li, S., Wang, Q., & Zhang, L. (2023). Optimization of ARTP mutagenesis parameters for enhanced bioactive compound production in industrial microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(4), 1123-1135.

Xu, N., Wang, L., Cheng, H., Liu, Y., Ma, Y., & Wu, J. (2020). High-throughput screening enabled by combining ARTP mutagenesis with microdroplet technology for the improved efficiency of probiotic strain development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9753-9765.

Xu, S., Li, Y., Liu, Y., & Wang, W. (2021). Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* through ARTP mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(3), 915–927. <https://doi.org/10.1002/bit.27678>

Xu, P., Li, L., Zhang, F., Stephanopoulos, G., & Koffas, M. (2021). Improving fatty acids production by engineering dynamic pathway regulation and metabolic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(31), 11299-11304.

- Zhang, C., Zhao, J., & Chen, W. (2021). Probiotic bioengineering: Challenges and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 20, 110. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01617-2>
- Zhang, D., Li, H., Liu, H., Zhang, C., & Jiang, L. (2014). Mutagenesis of *Lactobacillus plantarum* by atmospheric pressure plasma and optimization of its d-amino acid oxidase activity. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 97-106.
- Zhang, H., Liu, X., Chen, W., & Wang, S. (2013). Cell wall property alterations in ARTP-treated bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 892-901.
- Zhang, H., Wang, L., Liu, J., Zhao, S., Wang, J., Wang, S., & Feng, H. (2021). Advances in microbial enhanced oil recovery: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111775.
- Zhang, H., Xu, Y., Yu, C., Lu, M., Xu, Y., Li, X., ... & Zhao, Y. (2014). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5387-5396.
- Zhang, L., Gu, Z., Wang, Y., & Chen, W. (2015). Enhanced nisin production by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis of *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(16), 6743–6752. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6691-3>
- Zhang, L., Guo, Z., Wang, Y., & Chen, W. (2014). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis: A novel and effective mutagenesis tool for microbial breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6557–6565. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5793-5>

- Zhang, L., Guo, Z., Wang, Y., & Chen, W. (2018). Stability and genetic analysis of ARTP-induced mutations in *Lactobacillus plantarum* during serial subcultures. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 789–798. <https://doi.org/10.1111/jam.13701>
- Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., Yang, Z., & Li, S. (2022). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 270-275.
- Zhang, L., Zhang, C., Jiang, Q., Zhang, H., & Sun, L. (2021). Enhanced bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* LB-B1 with expanded antimicrobial spectrum through ARTP mutagenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1348-1358.
- Zhang, M., Chen, Y., Wang, L., & Li, X. (2019). Cell envelope modifications in ARTP-treated lactic acid bacteria and antimicrobial compound release. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21-22), 8891-8903.
- Zhang, Q., Miao, R., Feng, R., Yan, J., Wang, T., Gan, Y., Zhao, J., Lin, J., & Gan, B. (2023). Application of atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) to microbial breeding. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(8), 6466-6484.
- Zhang, X., Wang, S., Liu, H., & Chen, K. (2021). Enhanced bacteriocin production and broader antimicrobial spectrum in ARTP-mutagenized *Lactobacillus plantarum* LB-B1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1455-1470.
- Zhang, X., Wang, H., Li, Y., Zhang, Q., Liu, H., & Sun, M. (2024). Proteomic analysis reveals metabolic reprogramming in ARTP-mutagenized lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(8), e02156-23.

- Zhang, Y., Liu, Y., Ma, Q., Zhou, Z., Wang, J., & Chen, J. (2020). Optimization of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutation breeding conditions for *Lactobacillus* through response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(2), 434-450.
- Zhao, F., Zhang, C., Tang, X., Yang, X., & Ye, L. (2021). Recent advances in strain improvement for enhanced producibility and functionality of probiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(15), 2456-2472.
- Zhao, H., Wang, J., Li, Y., & Chen, X. (2020). Adaptive evolution and metabolic profiling of *Lactobacillus casei* mutants with improved growth and stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1025–1036. <https://doi.org/10.1111/jam.14567>
- Zhao, X., Yang, Z., Gai, K., Guan, Z., & Liu, L. (2020). Microencapsulation of probiotics by spray drying: preparation, characterization, and applications. *Food and Bioprocess Technology*, 13(1), 1-12.
- Zhao, Y., Chen, L., Wang, H., & Zhang, M. (2020). Organic acid mechanisms in antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 91, 103542.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881.

Figure 1 Comparison of the % lethality and expose ARTP time of *Lactobacillus* spp.

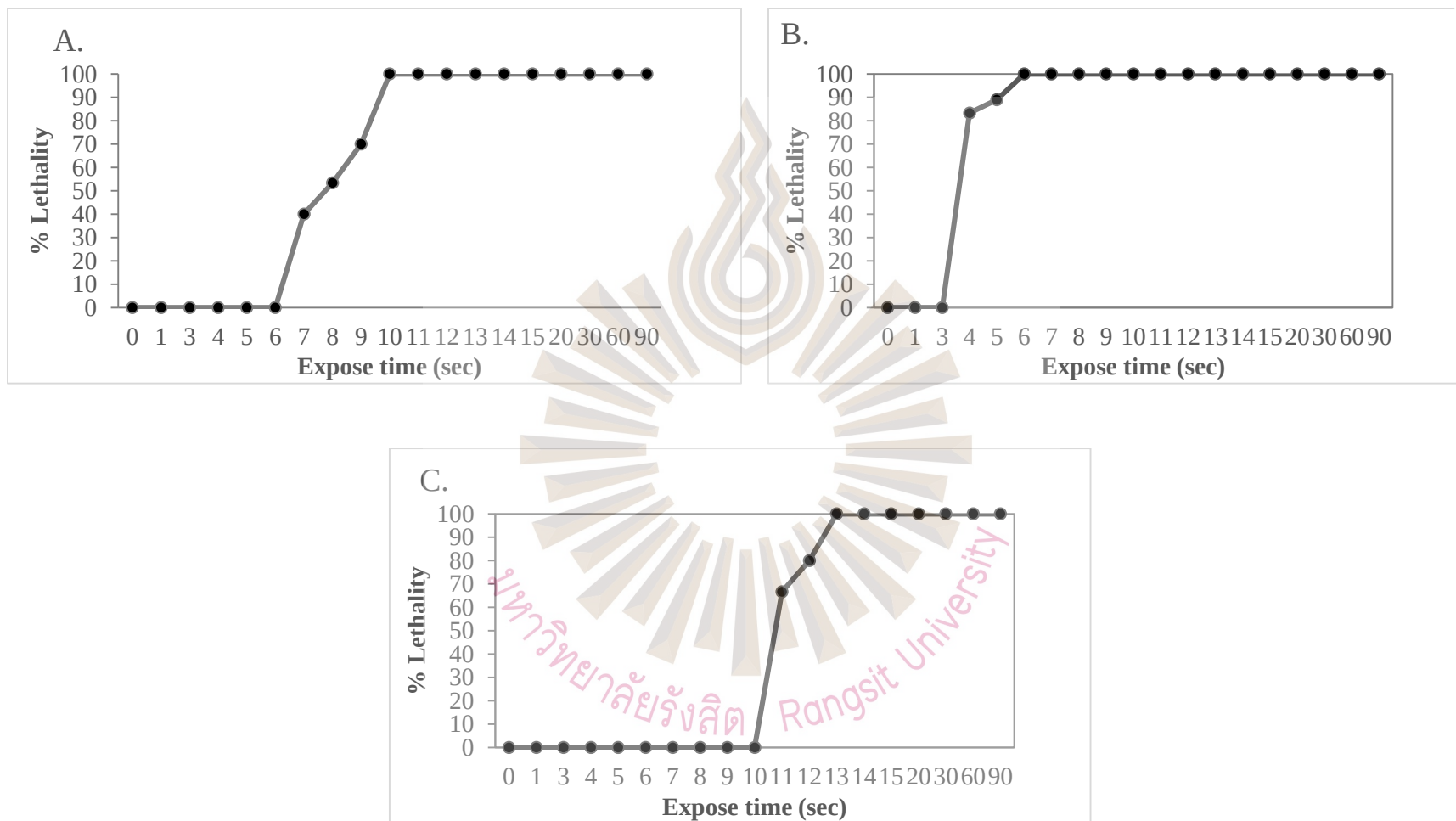


Figure 2 Comparison of mean DPPH values between wild type and candidate mutant strains of each *Lactobacillus* species

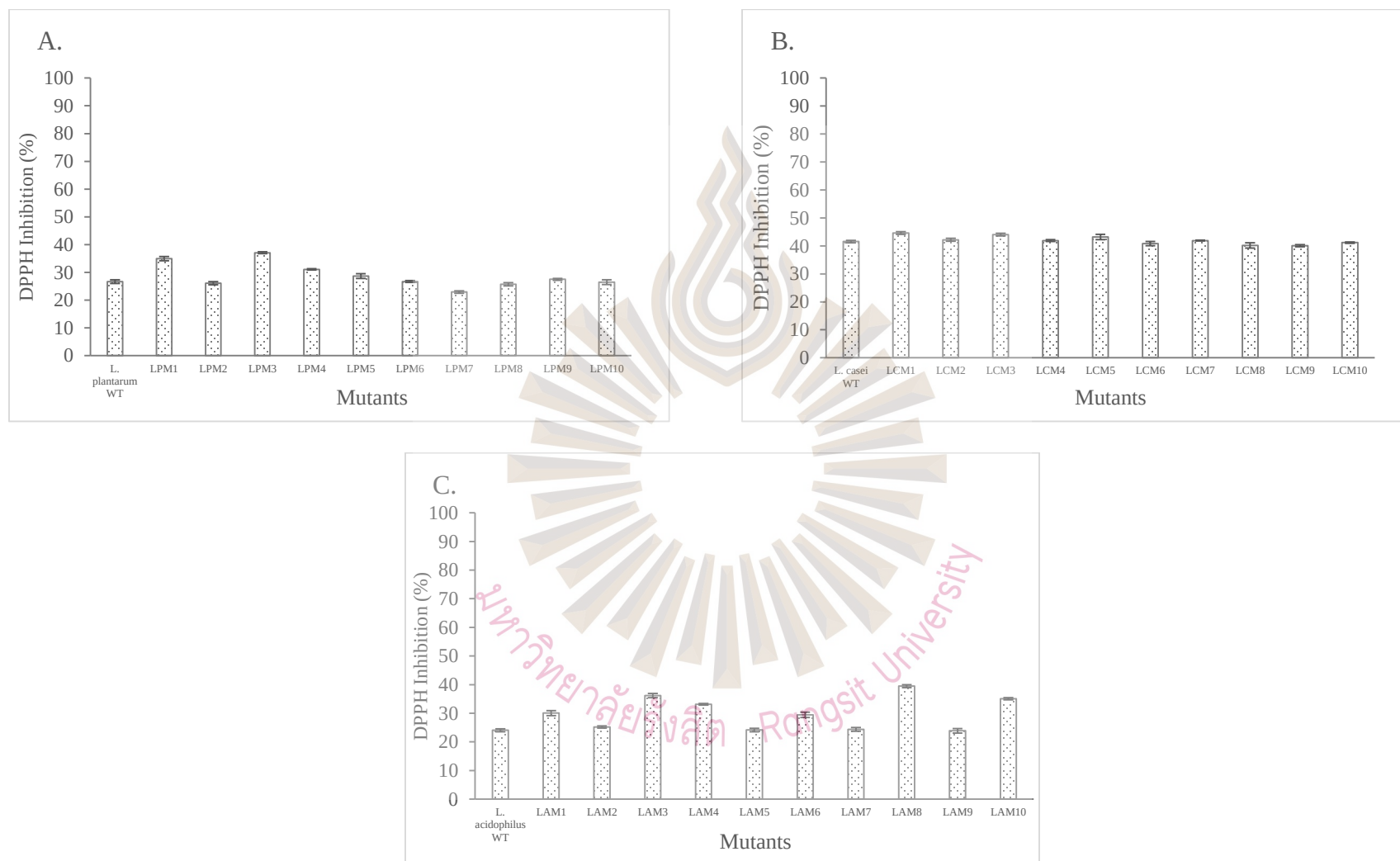


Figure 3 Comparison of growth rates between wild type and mutant strains of each *Lactobacillus* spp. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD)

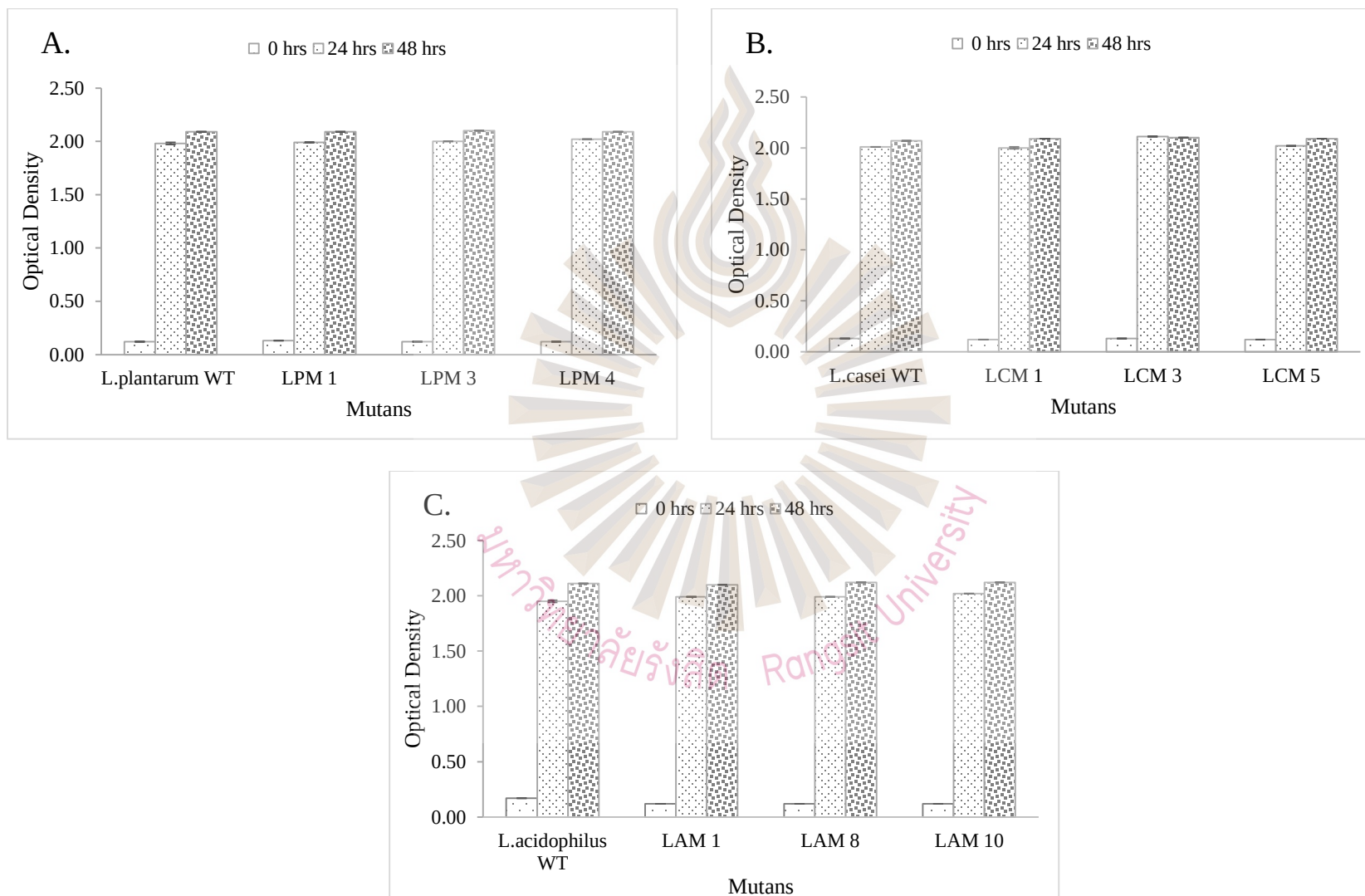


Table 1 Results of agar well diffusion assay using cell-free supernatant from *Lactobacillus spp.* wild type compared with mutant type against pathogenic bacteria/yeasts tested by agar well diffusion method. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD)

Unknown cell-free supernatant	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition zone (mm)								
		<i>Escherichia coli</i> ESBL	<i>Enterococcus faecalis</i> VRE	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> MDR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>L.plantarum</i> WT	100	11.0 $\pm$ 0.0	12.3 $\pm$ 0.6	-	8.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	8.7 $\pm$ 1.2	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPM 1	100	11.7 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	-	-	-	6.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
LPM 3	100	13.0 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 0.6	-	10.7 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	-	-
	50	-	11.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
LPM 4	100	11.3 $\pm$ 0.6	13.3 $\pm$ 0.6	-	10.0 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 0.0	-	7.3 $\pm$ 0.6	-	-
	50	-	11.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	10.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.casei</i> WT	100	-	-	10.0 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 1.0	9.3 $\pm$ 0.6	-	9.7 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCM 1	100	-	-	10.7 $\pm$ 0.6	-	10.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-	8.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	9.0 $\pm$ 1.0	-	-	-	-	-
LCM 3	100	-	-	9.7 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 1.7	10.0 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 0.6	-	5.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	9.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCM5	100	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	-	9.3 $\pm$ 0.6	-	9.7 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L.acidophilus</i> WT	100	10.3 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 0.6	-	-	8.3 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.6	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 1	100	-	-	-	10.3 $\pm$ 1.2	9.0 $\pm$ 1.7	-	-	9.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 8	100	11.0 $\pm$ 1.0	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	11.0 $\pm$ 0.0	-	8.3 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.0	-
	50	-	10.3 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM 10	100	10.0 $\pm$ 2.0	11.3 $\pm$ 0.6	-	-	11.0 $\pm$ 0.0	-	8.3 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 0.6	-
	50	-	9.7 $\pm$ 0.6	-	-	6.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-
	25	-	7.7 $\pm$ 0.6	-	-	-	-	-	-	-
Amikacin	1 mg/mL	29.3 $\pm$ 0.6	25.3 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 3.2	26.0 $\pm$ 1.0	20.7 $\pm$ 2.1	24.7 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	30.3 $\pm$ 0.6	-
Clotrimazole	1 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	25.3 $\pm$ 0.6

Table 2 Results of broth microdilution assay using cell-free supernatant from *Lactobacillus spp.* wild type compared with mutant type against pathogenic bacteria/yeasts tested by broth microdilution method. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

[illegible]

Table 3 Antibiotic susceptibility study results of each *Lactobacillus spp* wild type compare to mutant type. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

Unknown cell-free supernatant	Inhibition zone (mm)								
	Amikacin (AK; 30 μ g)	Cefoxitin (FOX; 30 μ g)	Ceftriaxone (CRO; 30 μ g)	Ciprofloxacin (CIP; 5 μ g)	Doxycycline (DO; 30 μ g)	Erythromycin (E; 15 μ g)	Gentamicin (CN; 10 μ g)	Imipenem (IPM; 10 μ g)	Vancomycin (VA; 30 μ g)
<i>L.plantarum</i> WT	31.33 $\pm$ 1.53	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	10.67 $\pm$ 1.15	14.33 $\pm$ 0.58	38.00 $\pm$ 2.00	32.67 $\pm$ 1.53	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00
LPM 1	26.67 $\pm$ 1.15	6.00 $\pm$ 0.00	21.33 $\pm$ 3.06	20.67 $\pm$ 1.15	17.00 $\pm$ 1.00	40.67 $\pm$ 1.15	38.00 $\pm$ 2.00	47.33 $\pm$ 1.15	6.00 $\pm$ 0.00
LPM 3	26.00 $\pm$ 2.00	15.33 $\pm$ 1.15	24.00 $\pm$ 2.00	10.67 $\pm$ 0.58	21.33 $\pm$ 1.53	42.67 $\pm$ 1.15	32.67 $\pm$ 3.06	42.00 $\pm$ 2.00	6.00 $\pm$ 0.00
LPM 4	24.67 $\pm$ 1.15	6.00 $\pm$ 0.00	17.00 $\pm$ 0.00	12.67 $\pm$ 1.15	18.00 $\pm$ 0.00	37.33 $\pm$ 1.15	32.00 $\pm$ 0.00	46.67 $\pm$ 3.06	6.00 $\pm$ 0.00
<i>L.casei</i> WT	10.33 $\pm$ 0.58	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	15.00 $\pm$ 1.00	15.67 $\pm$ 0.58	34.67 $\pm$ 1.53	33.67 $\pm$ 1.15	13.33 $\pm$ 1.15	6.00 $\pm$ 0.00
LCM 1	14.67 $\pm$ 0.58	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	19.33 $\pm$ 1.15	25.67 $\pm$ 3.06	39.33 $\pm$ 1.15	16.67 $\pm$ 1.15	34.00 $\pm$ 1.00	6.00 $\pm$ 0.00
LCM 3	15.33 $\pm$ 0.58	6.00 $\pm$ 0.00	15.33 $\pm$ 0.58	12.33 $\pm$ 0.58	16.00 $\pm$ 1.00	38.00 $\pm$ 2.00	35.67 $\pm$ 0.58	36.00 $\pm$ 2.00	6.00 $\pm$ 0.00
LCM5	13.67 $\pm$ 1.53	6.00 $\pm$ 0.00	6.00 $\pm$ 0.00	20.67 $\pm$ 1.15	22.67 $\pm$ 1.15	40.00 $\pm$ 0.00	14.00 $\pm$ 1.73	36.33 $\pm$ 1.53	6.00 $\pm$ 0.00
<i>L.acidophilus</i> WT	25.33 $\pm$ 1.15	0.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 0.00	17.33 $\pm$ 1.15	16.67 $\pm$ 0.58	32.00 $\pm$ 2.00	38.33 $\pm$ 0.58	39.67 $\pm$ 0.58	0.00 $\pm$ 0.00
LAM 1	34.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	16.00 $\pm$ 0.00	22.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	45.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
LAM 8	32.67 $\pm$ 0.58	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	15.00 $\pm$ 0.00	16.33 $\pm$ 0.58	35.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
LAM 10	30.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	27.00 $\pm$ 0.00	18.00 $\pm$ 0.00	20.00 $\pm$ 0.00	32.00 $\pm$ 0.00	30.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

Figure 4 Results of antioxidant activity study of cell-free supernatant at 25% concentration in *Lactobacillus spp.* wild type strains compared with mutant strains. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

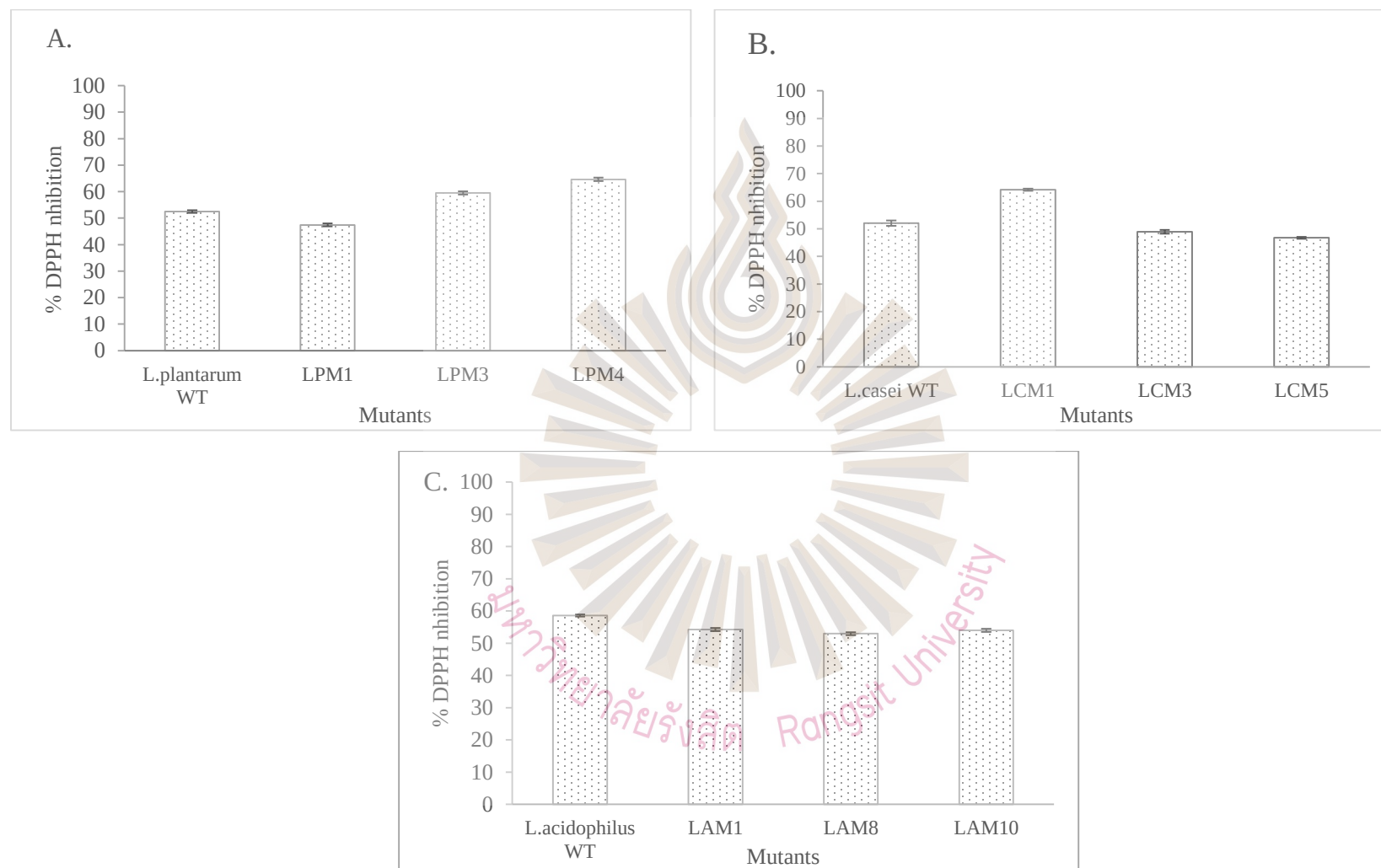


Table 4 DPPH total antioxidant assay results (μg Vitamin C equivalents) of cell-free supernatant in *Lactobacillus* spp. wild type strains compared with mutant strains. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

Unknown cell-free supernatant	Total anti-oxidant (μg Vitamin C equivalents)
<i>L.plantarum</i> WT	341.89 $\pm$ 3.40
LPM 1	307.05 $\pm$ 3.85
LPM 3	390.46 $\pm$ 4.01**
LPM 4	426.05 $\pm$ 4.85**
<i>L.casei</i> WT	338.93 $\pm$ 6.70
LCM 1	423.08 $\pm$ 2.80**
LCM 3	317.43 $\pm$ 4.49
LCM 5	302.23 $\pm$ 2.57*
<i>L.acidophilus</i> WT	384.53 $\pm$ 2.23
LAM 1	354.13 $\pm$ 3.58
LAM 8	345.23 $\pm$ 3.21
LAM 10	352.27 $\pm$ 3.58

** Increased value $p > 0.05$

Table 5 Total flavonoid content analysis results of cell-free supernatant in *Lactobacillus* spp. wild type strains compared with mutant strains. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

Unknown cell-free supernatant	Total Flavonoid Content (μg Quercetin equivalents)
<i>L.plantarum</i> WT	32.45 $\pm$ 0.10
LPM 1	31.45 $\pm$ 0.25*
LPM 3	32.61 $\pm$ 0.10
LPM 4	41.76 $\pm$ 1.13**
<i>L.casei</i> WT	42.76 $\pm$ 1.92
LCM 1	29.95 $\pm$ 0.77*
LCM 3	39.60 $\pm$ 2.45
LCM 5	35.50 $\pm$ 0.48*
<i>L.acidophilus</i> WT	36.94 $\pm$ 0.19
LAM 1	36.33 $\pm$ 0.10
LAM 8	37.99 $\pm$ 0.19**
LAM 10	31.06 $\pm$ 0.67*

Figure 6 Strain stability test results comparing % DPPH inhibition between *Lactobacillus* spp. wild type and mutant strains over 15 generations. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (Mean $\pm$ SD).

