

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

常壓非熱噴射式電漿應用於
鮭魚生魚片諾羅病毒失活效果之探討

**Application of non-thermal atmospheric plasma jet on
inactivation of norovirus on salmon sashimi**

張惟智

Wei-Chih Chang

指導教授：徐詮亮 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

中華民國一百零六年六月

June, 2017

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 張惟智 君所提之論文

常壓非熱噴射式電漿應用於

鮭魚生魚片諾羅病毒失活效果之探討

Application of non-thermal atmospheric plasma jet on
inactivation of norovirus on salmon sashimi

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

詹鴻輝 元培醫事科技大學食品科學系教授

黃光裕 東海大學生命科學系教授

黃怡靜 國立勤益科技大學化工與材料工程系助理教授

指導教授：陳 謹 良

謝誌

研究所這兩年的生活，不論課業、實驗以及觀念，都受到許多貴人的幫助，才能夠順利完成碩士論文。

首先感謝指導教授徐詮亮博士，一開始甚麼都不懂的我，老師總是細心的耐心的教導，每當我遇到瓶頸時，老師總是適時的給予建議與鼓勵，使我在碩班這段期間，不只學到學術研究上的收穫以及邏輯思考。

感謝口試委員-元培醫事科技大學食品科學系詹鴻得博士、東海大學生命科學系黃光裕博士及國立勤益科技大學化工與材料工程系黃怡銘博士，在百忙之中多次審閱本文，並在口試過程中，給予鼓勵跟肯定，同時提出許多寶貴的建議與意見，使本論文更臻完善，學生也感受獲益良多，在此謹致上最深的謝意。

感謝東海大學環境科學與工程學系郭獻文博士，提供儀器設備，以及環工系的宜芳學妹與安齊學妹，感謝妳們細心的教學，不論是實驗原理或儀器操作，王時樂學弟，感謝你幫我開門進實驗室，讓我順利完成實驗；感謝江家柏凱學長在儀器上與口試時，幫忙與協助。

感謝實驗室所有夥伴的鼓勵及協助。謝謝鵬年、松佑與性樺學長的教導，讓我能夠快速步入軌道；謝謝欣瑜與芯辰學妹的幫忙及鼓勵；

謝謝專題生婷蔚與思涵學妹的扶持與鼓勵。你們讓我的研究生活更多采多姿。

感謝佑星學長、嘎嘎、映竹、瑋綾、上詠學弟與文彥學妹，陪著我嬉戲聊天；感謝丁滿學長、萬宇學長、仁宜、紅茶、善殷學弟、恆毅學弟、仲雯學妹與純蕙學妹，一起打球運動；感謝所有幫助過我的師長與同學們，至上由衷的感謝。

最後感謝父母在我求學期間，不論是物質或精神上給我所有的支持，讓我能夠毫無顧慮的專心在課業上。

張惟智 謹至於

東海大學食品科學系碩士班

中華民國一百零六年七月

摘要

諾羅病毒(Norovirus)是全球病毒性腸胃炎爆發的主要原因，許多諾羅病毒疫情與水產品或新鮮農產品有關，其中透過加熱、紫外線照射、氯與過氧化氫等，進行物理或化學處理，可使諾羅病毒失活；然而，這些方法會造成食品質地的變化並導致營養成分的流失。本研究的目的是利用常壓非熱式噴射電漿對鮭魚生魚片表面諾羅病毒失活之應用，並評估電漿處理對鮭魚生魚片品質(脂質氧化、pH 值、顏色、質地)影響；電漿操作條件包括處理時間(0、3、6、9 和 12 分鐘)、電壓(180 伏特)、電極間距(1 公分)、工作氣體(空氣、氧氣與氮氣)以及氣體流速(15 L/min)；研究結果顯示，當工作氣體為空氣時，處理 9 分鐘，諾羅病毒可由 2.7×10^4 virus particles/g 至完全失活，工作氣體為氧氣時，處理 12 分鐘，諾羅病毒完全失活，氮氣則沒有效果；經電漿處理鮭魚生魚片品質，工作氣體不論空氣或氧氣，均對鮭魚生魚片的 TBARS 值與 pH 值下降，顏色測定的 L 值和 a 值下降而 b 值上升，質地分析則發現硬度上升與彈性下降，雖然在統計上均有顯著差異，但都在人體感受範圍內；依照上述結果得知，工作氣體為空氣時，諾羅病毒失活效果最好，且對鮭魚生魚片品質影響最小，因此以空氣為工作氣體產生之電漿未來可望應用於食品之病毒失活。

關鍵字：常壓非熱式噴射電漿、諾羅病毒、鮭魚生魚片、品質評估

Abstract

Norovirus are the leading cause of viral gastroenteritis outbreaks worldwide. Many norovirus outbreaks have been epidemiologically associated with contamination of seafood or fresh produce. Norovirus inactivation to physical and chemical treatments by chlorine, hydrogen peroxide, heating and UV irradiation, while those methods cause changes in food tissues and lead to loss of nutrients. The purpose of this study is to develop the application of non-thermal atmospheric plasma jet for inactivation of norovirus on the surface of salmon sashimi. The influences of plasma treatment on the qualities of salmon sashimi were also investigated (Lipid oxidation, pH, color, texture analysis). Operating conditions of plasma include processing time (0, 3, 6, 9 and 12 min), electric voltage (180 V), electrode spacing (1 cm), working gases (air, oxygen and nitrogen) and flow rate (15 L/min). The results of the research showed that norovirus could be completely inactive from 2.7×10^4 virus particles/g when working gas is air and processing time is 9 min. When working gas is oxygen and processing time is 12 min, norovirus is completely inactivate while nitrogen has no effect. Either air or oxygen, could make salmon sashimi, which is treated by plasma, a lower TBARS value and pH value, a lower a value, a lower L value, and a higher b value of color measurement. On the other hand, texture analysis found that the hardness rise and the elasticity fall. Although there is significant difference in statistics, it's still within the range of our feelings. According to the above results, the air has the best outcome of inactivation of norovirus and the least effect on salmon sashimi. In

conclusion, we are hoping that, plasma with air as working gas can be applied to inactivation of norovirus in food.

Key words : Non-thermal atmospheric plasma jet, Norovirus, Salmon sashimi, Quality evaluation



目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
第一章 緒言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究動機與目的.....	2
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 諾羅病毒.....	3
2.1.1 諾羅病毒的發現與型態.....	3
2.1.2 諾羅病毒現今研究與替代研究.....	5
2.1.3 諾羅病毒實驗室診斷方法.....	5
2.1.4 諾羅病毒失活方法.....	7
2.2 電漿.....	12
2.2.1 電漿基本理論.....	12
2.2.2 常見電漿種類.....	13
2.2.3 電漿技術應用於病毒失活.....	17
2.2.4 電漿失活病毒機制.....	20

2.3 生魚片.....	22
2.3.1 生魚片產品特性與種類.....	22
2.3.2 鮭魚.....	22
2.3.3 生魚片加工方法.....	23
2.3.4 病毒之危害.....	23
第三章 材料與方法.....	26
3.1 實驗材料與儀器.....	26
3.1.1 諾羅病毒.....	26
3.1.2 標準品製備.....	26
3.1.3 實驗樣品與製備.....	28
3.1.4 實驗試藥.....	28
3.1.5 儀器設備.....	30
3.2 實驗架構.....	35
3.3 電漿處理.....	36
3.4 諾羅病毒之檢測.....	36
3.4.1 鮭魚生魚片前處理.....	36
3.4.2 病毒濃縮.....	37
3.4.3 RNA 病毒核酸萃取.....	37
3.4.4 反轉錄反應.....	38

3.4.5 諾羅病毒量化分析.....	38
3.5 電漿處理對鮭魚生魚片品質測定	46
3.5.1 脂質氧化酸敗測定.....	46
3.5.2 pH 值	47
3.5.3 顏色測定.....	47
3.5.4 質地分析.....	48
3.6 統計分析.....	49
第四章 結果與討論	58
4.1 電漿利用不同工作氣體對諾羅病毒失活效果	58
4.2 電漿處理，對鮭魚生魚片品質之影響	63
4.2.1 硫巴比妥酸價.....	63
4.2.2 pH 值.....	67
4.2.3 顏色測定.....	69
4.2.4 質地分析.....	73
第五章 結論.....	76
參考文獻.....	78
中文部分.....	78
英文部分.....	82
網路部分.....	89

表目錄

表 2-1 平衡電漿與非平衡電漿.....	15
表 2-2 電漿技術應用於病毒失活.....	19
表 2-3 活性氧類 (ROS) 與活性氮類 (RNS)	21
表 3-1 反轉錄.....	43
表 3-2 本研究對諾羅病毒第二型所使用的引子.....	44
表 3-3 Real-Time PCR 調控溫度梯度.....	45
表 3-4 擠壓測試參數設定與探頭規格.....	55
表 4-1 不同工作氣體對鮭魚生魚片之硫代巴比妥酸價測量.....	66
表 4-2 不同工作氣體對鮭魚生魚片 pH 值之影響.....	68
表 4-3 空氣電漿處理鮭魚生魚片之顏色測定.....	71
表 4-4 氧氣電漿處理鮭魚生魚片之顏色測定.....	72
表 4-5 不同工作氣體對鮭魚生魚片硬度之影響.....	74
表 4-6 不同工作氣體對鮭魚生魚片彈性之影響.....	75

圖目錄

圖 2-1 諾羅病毒	4
圖 2-2 常壓電漿源裝置示意圖	16
圖 2-3 麥奇鈎吻鮭 (虹鱒)	24
圖 2-4 大西洋鮭魚	24
圖 2-5 潮鯛生魚片之製造流程	25
圖 2-6 鮪魚生魚片之處理流程	25
圖 3-1 常壓非熱噴射式電漿系統組成示意圖	33
圖 3-2 常壓非熱噴射式電漿設備實體圖	34
圖 3-3 實驗架構	35
圖 3-4 電漿處理鮭魚生魚片之流程圖	40
圖 3-5 諾羅病毒檢測之流程圖	41
圖 3-6 諾羅病毒 GII標準品濃度檢量線	42
圖 3-7 Malonaldehyde 和 TBA 的縮合物	50
圖 3-8 硫巴比妥酸價之流程圖	51
圖 3-9 pH 檢測之流程圖	52
圖 3-10 顏色測定之流程圖	53
圖 3-11 CIELAB 色彩空間	54
圖 3-12 全質構分析	56

圖 3-13 質地分析之流程圖	57
圖 4-1 空氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響	60
圖 4-2 氧氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響	61
圖 4-3 氮氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響	62
圖 4-4 不同濃度之丙二醛標準溶液	64
圖 4-5 標準溶液丙二醛含量之檢量線	65



第一章 緒言

1.1 研究背景

諾羅病毒(Norovirus)是全球病毒性腸胃炎爆發的主要原因。自2012年起，諾羅病毒已躍升為台灣食品中毒病因物質之主因，且其比率逐年增加，2015年食品中毒病因物質判明案件數中，病毒所引起之食品中毒已經高達47%，共發生64起案件，總計1,653名患者，而美國及日本諾羅病毒也占食品中毒病因物質判明45%以上（鄭，2017）。依據美國疾病管制局(CDC)的評估，諾羅病毒57%經由食物傳播、16%為人傳人、3%藉由被病毒污染的水傳播，顯見透過食物傳播為主要的方式之一，然而，傳統失活病毒方法，例如加熱，冷凍乾燥不能應用於生食及熱敏感食物產品，因為會造成食品化學和物理劣化，導致營養成分的流失。因此，尋找合適的措施來減少這些產品的食因性疾病的風險與品質控制是非常重要的。

本篇研究旨在應用常壓非熱噴射式電漿系統處理生食及熱敏感食品之諾羅病毒失活，除測試其對食材上之諾羅病毒失活效果，更進一步探討電漿處理對各項產品品質指標之影響，期望能開發一套操作較安全、快速且能維持高品質之生食的電漿失活病毒技術。

1.2 研究動機與目的

2016 年底，日本發生諾羅病毒大流行事件，根據日本國立感染症研究所表示，諾羅病毒單週感染人數破 6 萬例，創下 10 年來新高，衛生福利部疾病管制屬呼籲赴日少吃生魚片，其中流行病毒型別以諾羅病毒 GII 為主，而台灣地區生魚片流通業者最常供應之魚種為鮭魚 (77%)，但常因前處理不當及運送過程之疏忽，而造成食物中毒不幸事件發生，因此本研究將針對鮭魚生魚片，應用常壓非熱噴射式電漿來進行諾羅病毒 GII 失活，並評估多種操作參數對諾羅病毒 GII 失活效果及品質評估之影響。

本研究主要探討：

1. 測試不同電漿操作條件下之諾羅病毒 GII 失活效果，包括操作時間、工作氣體種類等，並由不同條件下尋求最適化之操作條件。
2. 探討電漿處理後，對鮭魚生魚片之品質評估，包括：脂質氧化酸敗測試、pH 值、顏色測定及質地分析。

第二章 文獻回顧

2.1 諾羅病毒

2.1.1 諾羅病毒的發現與型態

諾羅病毒 (Norovirus, NoV) 是在 1962 年美國俄亥俄州的諾沃克 (Norwalk) 發生的流行性腸胃炎事件 (衛生福利部食品藥物管制署, 2010), 在 1972 年利用免疫電子顯微鏡 (Immuno-Electron Microscopy; IEM) 技術, 檢驗為胃炎的糞便檢體, 並發現直徑為 27 nm 的病毒顆粒 (圖 2-1) (Kapikian *et. al.*, 1972)。

諾羅病毒屬於杯狀病毒科 (*Caliciviridae*), 在巴爾的摩分類上為 Group IV, 單股核糖核酸 (Linear positive-sense sing-stranded (+)ssRNA), 病毒外型呈現正二十面體 (Icosahedron) 構造 (Venkataram Prasad *et. al.*, 2016), 病毒顆粒直徑約為 27~32 nm (衛生福利部食品藥物管制署, 2010)。

目前, 有五個識別諾羅病毒基因型組, 其中 G I、G II 與 G IV 這三個基因型影響人類, 有超過 25 個不同的基因型已經確定在這三個基因型組內; 自 2002 年以來, G II.4 基因型的變種已經是最常爆發的基因型 (Center for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.A., 2013)。

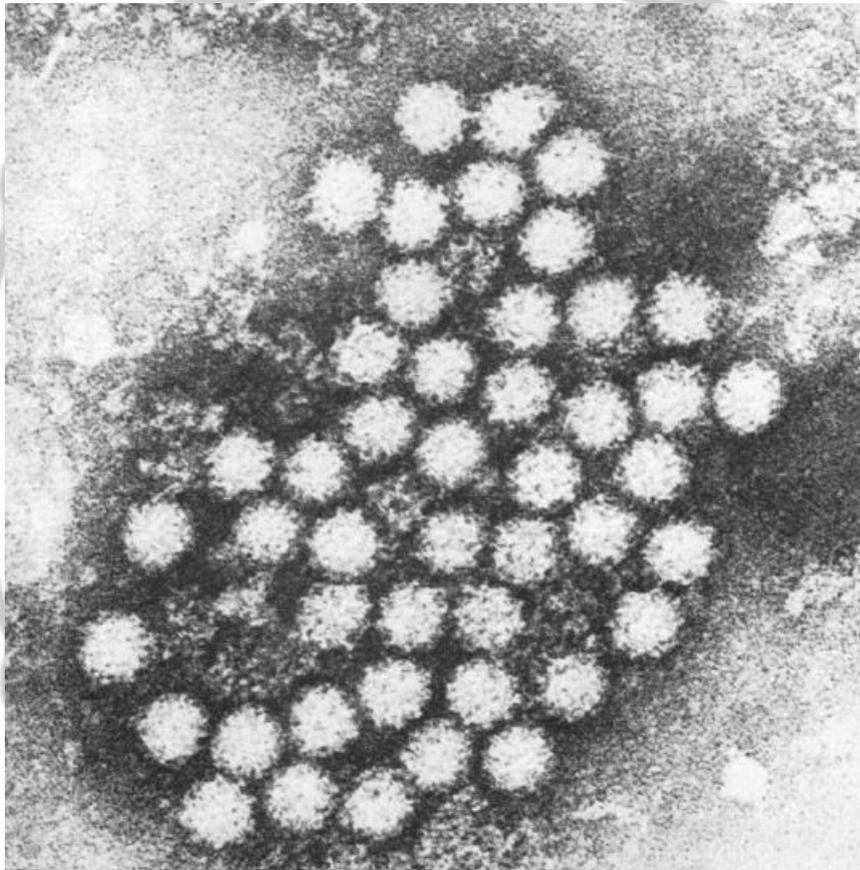


圖 2-1 諾羅病毒

Fig. 2-1 Norovirus

(圖片來源 : Kapikian *et. al.*, 1972)

2.1.2 諾羅病毒現今研究與替代研究

目前人類諾羅病毒的研究主要有二大困難，1.人類諾羅病毒無法進行細胞培養，因此無法取得人類諾羅病毒 2.人類諾羅病毒沒有小型的動物培養模式。由於人類諾羅病毒無法以細胞培養取得，因此人類諾羅病毒的研究相當少，所以，目前幾乎以諾羅病毒的病毒顆粒(VP1)、老鼠的諾羅病毒或與諾羅病毒同屬杯狀病毒科(*Caliciviridae*)的貓杯狀病毒(Feline Calicivirus ; FCV)、Porcine sapovirus 和 Tulane virus 做取代，進行間接研究其特性，但近幾年已經能利用分子生物學的方法，檢測人類諾羅病毒 (Li *et. al.*, 2012 ; DiCaprio, 2017) 。

2.1.3 諾羅病毒實驗室診斷方法

人類諾羅病毒不能在細胞培養物中生長 (Wang *et. al.*, 2014 ; DiCaprio, 2017)。因此，診斷方法集中在檢測病毒 RNA 或抗原。目前諾羅病毒之鑑定方法如下：

1. 即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

RT-qPCR 實驗是檢測諾羅病毒的首選的實驗室方法。這些測定法是非常敏感的，並且可以檢測每個反應少到 10 至 100 諾羅病毒數量。利用不同的引子來區分基因型組 I 和基因型組 II 諾羅病毒。RT-qPCR 實驗也定量和可提供的病毒載量的估計。所述測定法可用於檢測在糞便，嘔吐物，食物，水，和環境樣品諾羅病毒。

2. 反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase chain reaction, RT-PCR)

使用極少量的基因組 DNA 或 RNA 樣品中的特定基因片段，在數小時內擴增上百萬倍，透過 RT-PCR 產物的序列分析諾羅病毒的基因分型，但無法判別病毒載量，只能判斷不同基因型的諾羅病毒。

3. 酶免疫測定 (Enzyme Immunoassays, EIA)

快速商業測定，如酶免疫測定，檢測諾羅病毒抗原最近被開發出來，在流行病學應用於調查糞便和環境樣品中發現諾羅病毒毒株的遺傳表徵，美國食品藥物管理局已經禁止因環境造成諾羅病毒爆發期間，利用此方法檢測，因為環境影響評估目前對於諾羅病毒病例的診斷不夠敏感 (< 50%)。

(Center for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.A., 2012 ;

Center for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.A., 2013)

2.1.4 諾羅病毒失活方法

病毒的感染對人類健康造成威脅，無論是在醫療、環境保護、食品衛生安全等領域，尤其食品跟人類是息息相關，是我們生命能量的重要來源。失活是指病毒受到理化特性因素影響之後失去感染性，然而病毒失活有好幾種方法，不論是物理/化學方法各有其優缺點與使用限制，必須針對食品特性選擇出適合的方法。

物理方法

物理方法物理方法包含熱處理、放射線處理以及鹽漬等，各有優缺點，以下將詳細介紹。

1. 熱 (Thermal)

病毒大多耐寒不耐熱，加熱 56°C ，30分鐘即被失活，熱讓病毒失活機制主要是熱力使病毒殼蛋白和包膜蛋白變性，導致無法吸附宿主細胞表面與病毒增值所需的酶類變性，進而影響病毒複製過程(劉等，2016)。有文獻指出溫度 72°C ，處理時間長達5分鐘，諾羅病毒完全失活，而溫度 100°C ，處理時間2分鐘，就能使諾羅病毒完全失活 (Wang *et. al.*, 2014)。不過，熱不能在生鮮或新鮮食物產品中使用，因為它們會導致食品品質劣變，影響感官品質 (Wu *et. al.*, 2016)。

2. 放射線 (Irradiation)

人類諾羅病毒暴露在紫外線下，輻射劑量為 1 J/cm^2 ，人類諾羅病毒完全失活；人類諾羅病毒隨著紫外線輻射劑量越高，病毒數量降低 (Wang *et. al.*, 2014)。

美國，FDA已經批准3種輻射包括電子束， γ 射線和X射線應用於食品上 (General Accounting Office (GAO), 2000)。另外，食品輻照是允許在57個國家；有70多個商業輻照裝置在世界上(Ahn *et. al.*, 2013)。有文獻指出，X射線針對諾羅病毒的照射，會隨著X射線劑量的增加，使諾羅病毒失活效果越好 (Wu *et. al.*, 2016)。

γ 射線擁有高能量且具有極強的穿透力，可以直接破壞病毒的遺傳物質，造成無法修復之損傷，同時會使胞內外之水分子裂解產生自由基，如氫氧基、氫離子及過氧化氫等，這些活性物質會與病毒內遺傳物質、核殼等產生反應，造成結構改變和變性，造成生理機能無法正常運作，最終讓病毒失活。 γ 射線破壞病毒體結構和降解病毒蛋白和基因組RNA，導致病毒失活 (Feng *et. al.*, 2011)。

電子束處理後，利用RT-PCR，結果顯示照射降解病毒基因組RNA，電子束的很可能與 γ 射線失活諾羅病毒機制相同，損害病毒的核酸，造成病毒失活 (Predmore *et. al.* (a), 2015)。

脈衝光對鼠諾羅病毒的減少成比例效果，此技術可用於在飲用水或食品處理表面，以使病毒失活 (Jean *et. al.*, 2011)。

由於輻射功能強大的效果，可能會導致對輻照食品安全性的擔憂，若發生在生物體中，對DNA的損傷最大，一旦遭受破壞，蛋白合成或遺傳因子的複製都會受到干擾，導致細胞死亡或癌症，而輻射線對人的遺傳上亦復如此，受輻射線傷患者對後代的確有某種程度的影響，通常其危險率與輻射線成正比，但不會完全沒關係 (江，1992；左卷等，2003；Kang *et. al.*, 2016)。

3. 高靜水壓 (High hydrostatic pressure)

高靜水壓處理已被應用於生食貝類，果汁，果酒，果醬和果凍，飲品酸奶和果汁產品，切碎的洋蔥和即食肉類食品 (Kingsley *et. al.*, 2005)。高靜水壓處理不會破壞共價鍵，保持蛋白質的一級結構和保留的外觀，風味，質地和未處理的產品的營養品質 (Murchie *et. al.*, 2005)。高靜水壓處理鼠諾羅病毒，病毒外殼蛋白或抗原的降解破壞 (Lou *et. al.*, 2011)。

4. 鹽漬 (NaCl)

在鹽漬牡蠣中加入10%的鹽濃度使諾羅病毒和A型肝炎病毒幾乎完全失活 (99%)，主要原因與水活性有關，其中抗病毒機制可能

包括干擾病毒RNA的分子結構和病毒酶活性 (Park *et. al.*, 2014)。

化學方法

化學處理主要為病毒衣殼和病毒受體之間的相互作用，其中影響衣殼結合病毒受體能力，造成病毒核酸遭受破壞，使病毒失活 (Wang *et. al.*, 2014)。

1. 乙醇 (Ethanol)

70%乙醇對人諾羅病毒的失活，從2.5 log減少至0.05 log，顯著的下降，然而，將病毒濃度濃縮10倍，3.32 log減少至2.37 log，幾乎沒有作用，因此考慮到諾羅病毒屬於高度傳染力，70%乙醇對人諾羅病毒的消毒有限 (Wang *et. al.*, 2014)。

2. 氯 (Chlorine)

目前清洗新鮮農產品與美國的綠葉蔬菜，最常用的消毒劑是氯（高達200 ppm），有文獻指出，16 ppm的氯就能使人類諾羅病毒失活 (Wang *et. al.*, 2014)。

化學方法能失活大多數細菌與病毒，但失活病毒效果不如細菌，且化學方法會有藥劑殘留問題以及在消毒過程中，對操作人員造成危害 (劉，2014；劉等，2016)。

3. 臭氧 (Ozone)

臭氧和氯一樣是一個非常強大的氧化劑，但是臭氧的消毒能力和氧化性都比氯強，能氧化水中的有機物，並能殺滅芽孢及細菌。有文獻指出，臭氧破壞病毒顆粒的結構和降低病毒蛋白質，但保留的 RNA 完好無損 (Predmore *et. al.* (b), 2015)。



2.2 電漿

電漿(Plasma)在 1928 年由蘭牟爾和湯克斯以電漿震動的發現者聞名，而物質通常以固體、液體及氣體三種狀態存在，電漿則是之後物質的第四型態 (李等, 2006)。以水的物理性質說明，當低能量時，水分子動能小於氫鍵束縛能時，水分子與水分子將被固定住，成為固態，加入能量，使水分子動能與氫鍵束縛能相等，固體開始溶化變成液態，加入高能量，使液態開始汽化變成氣態，在施加更大的能量，使氣體外的電子脫離原來軌道變成離子化型態。因為電漿不同於固液氣三態，所以，又稱物質的第四型態，而伴隨著電漿的產生，同時也衍生出自由電子，正負離子，部分自由基，可見光，UV 光，臭氧 (O'Connor *et. al.*, 2014)。

2.2.1 電漿基本理論

電漿可分為平衡電漿與非平衡電漿(表 2-1)，其定義為部分或完全游離的氣體，包含等數的正、負電荷與一些不同數目為游離分子或原子；當施加於氣體的電場足夠大時，會造成氣體崩潰而游離化，於是產生電漿。電漿是由因某種方式而釋出的自由電子所誘發，而這些自由電子從電場中獲得動能，在它們穿越氣體的過程中，將會與氣體分子產生碰撞而所失能量，這些能量經轉換並使得氣體分子游離(即釋放出電子)，被釋放出的自由電子可再從電場中獲得動能，並重複

上述碰撞游離的程序，所以，每當外加的電壓大過氣體的崩潰位能時，電漿就會持續在整個反應腔中形成 (施，2005；陳&徐，2013)。

電漿在不同密度與溫度下，產生不同的特徵 (傅等，2007)。在常見之一般人為電漿中，電子溫度甚高，約 $1-9 \times 10^4$ K，即攝氏數萬度之高，但因電子比熱甚小，且反應器腔體與氣體吸收電子能量，腔體溫度僅比室溫稍高(約攝氏 40-70度)，對環境影響不大 (龍，2006)。

2.2.2 常見電漿種類

普遍的常壓電漿(圖2-2)包含電漿火炬(plasma torch)、暈光放電(corona discharge)、介電質屏蔽放電(dielectric barrier discharge, DBD)和常壓噴射式電漿(atmospheric pressure plasma jet, APPJ) (王，2009)。

電漿火炬是熱電漿技術中重要的一部分，出口溫度可達到數千度以上，普遍應用於金屬冶煉；暈光放電以電極尖端與材料間產生強電場進行放電，溫度介於 50-40 °C，但電漿密度隨著放電電極與材料表面的距離增大而快速減少，影響電漿的均勻度，造成電極損壞，因此應用上容易受限；介電質屏蔽放電是在兩端電極間加入一層或數層介電質材料來防止電弧產生，常見的介電質材料有玻璃、石英或陶瓷，此高介電物質在放電過程中具有三種功能：(1)使放電較為穩定(2)放

電分布較為均勻，避免如暈光放電不均勻的現象(3)電極可製作成多種形狀，使反應腔設計具有彈性，目前此技術廣泛運用於工業上，製造臭氣與空氣清淨處理，但操作電壓高，通常 20kV 以上的高壓電，因此有操作人員需特別注意安全；常壓噴射式電漿由一個或兩個電極的氣體噴嘴組成，並通過氣流輸送到外部以及待處理的物體，在放電區通入惰性氣體使之產生均勻且穩定的輝光放電，因此產生的電漿溫度較低，可以避免對材料表面的熱破壞性，並且擁有生命期較長的半穩態與活化粒子，藉由擴散作用到達處理基板表面進行蝕刻作用，其中特色為電漿面積小、能量集中，但受限於處理面積狹小，因此需配合可移動平台進行處理，由於常壓噴射式電漿溫度低且放電均勻，因此多被應用聚合物表面處理 (Schütze *et. al.*, 1998; Reuter *et. al.*, 2009; 王, 2009; 蘇, 2009; 李, 2001; 陳, 2012; Woedtke *et. al.*, 2013; 陳, 2013; 徐等, 2014)。

由於常壓噴射式電漿溫度低、放電均勻以及能量集中，且可利用移動平台進行大面積處理，因此本研究選用常壓噴射式電漿進行實驗。

表2-1 平衡電漿與非平衡電漿

Table. 2-1 Properties of equilibrium plasma and non-equilibrium plasma

(資料來源：陳&徐，2013)

	平衡電漿	非平衡電漿
定義	完全離子化氣體	部分離子化氣體
離子化程度	100 %	$10^{-4} - 10^{-1} %$
系統壓力	> 1 大氣壓	≤ 1 大氣壓
電漿溫度(T_g)	>10,000 K	~300 K (室溫)
電子溫度(T_e)	$T_e = T_g$	$T_e/T_g = 10-100$
氣體狀態	熱平衡狀態	非熱平衡狀態

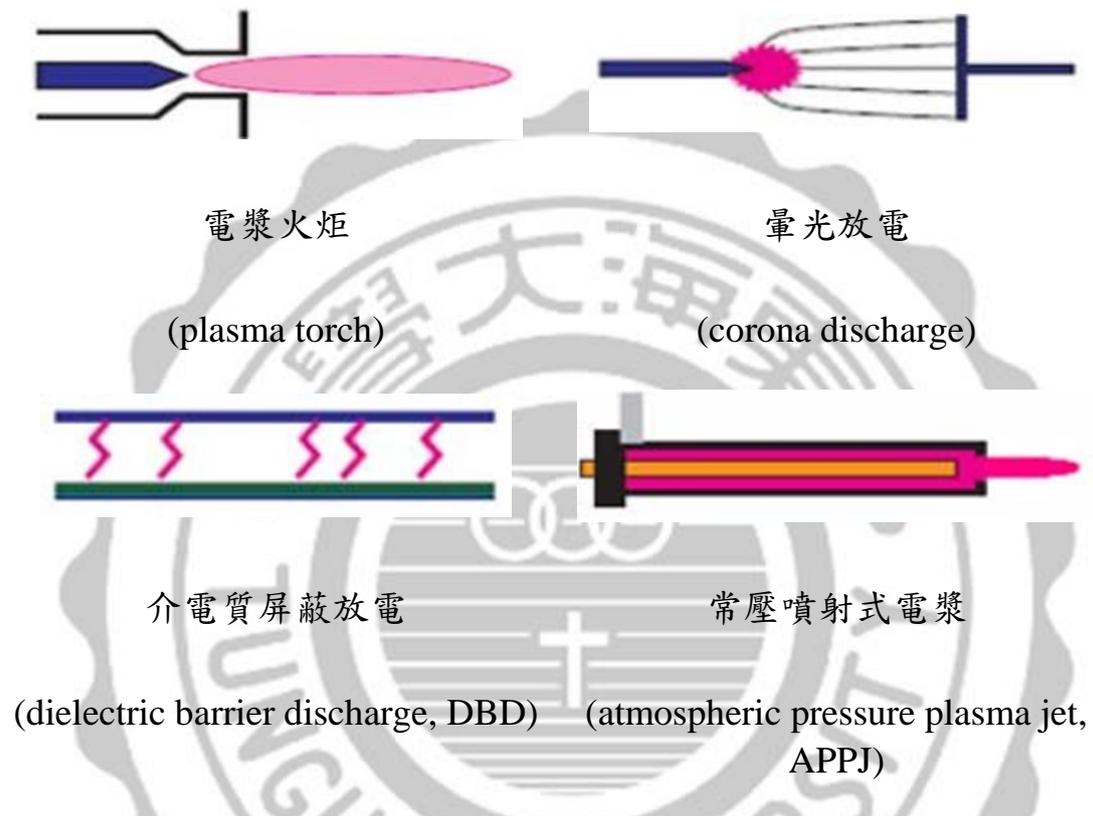


圖 2-2 常壓電漿源裝置示意圖

Fig. 2-2 Schematic diagram of atmospheric pressure plasma

(圖片來源：王，2009)

2.2.3 電漿技術應用於病毒失活

在過去的研究中，常壓電漿失活病毒已經被證明（表 2-2），以下將詳細說明：

Whittaker 等人(2004)利用射頻電漿對牙科儀器表面上的朊病毒蛋白(Prion protein)進行失活，工作氣體為氫氣與氧氣的混合氣體，處理後使用掃描式電子顯微鏡進行觀察，該研究結果顯示電漿處理後，儀器表面沒有附著朊病毒蛋白，且不會對儀器有任何的損壞。

Zimmermann 等人(2011)利用介電質電漿針對腺病毒(Adenoviruses)溶液進行失活，工作氣體為空氣，該研究結果顯示腺病毒經電漿處理 240秒，減少 6 log PFU/ cell。

Bae 等人(2015)利用常壓噴射式電漿針對常見於新鮮肉類產品之表面上鼠諾羅病毒(Murine norovirus)及A型肝炎(Hepatitis A virus)病毒因子，以氫氣為工作氣體，該研究發現隨電漿處理時間的增長，提升病毒失活之效果，同時對肉品品質沒有明顯影響。

Wang 等人(2016)利用非熱電漿對新城疫病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 與禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV)進行處理，將處理後的病毒，使用掃描電子顯微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) 和透射電子顯微鏡(Transmission electron microscopy, TEM) 觀

察病毒型態變化，同時將處理後病毒，注射到雞胚中，進行120小時的觀察，工作氣體為含有88%Ar，2%O₂和10%N₂的混合氣體，該研究結果顯示，電漿處理2分鐘，新城疫病毒與禽流感病毒完全失活，在掃描電子顯微鏡觀察出病毒結構受損，透射電子顯微鏡觀察出病毒收縮，並且，胚胎的存活率為100%。

Lacombe 等人(2017)利用常壓非熱電漿針對藍莓表面之鼠諾羅病毒(Murine norovirus)及杜蘭病毒(Tulane virus)病毒因子，以空氣做為工作氣體，該研究結果顯示，杜蘭病毒經電漿處理 120秒，減少3.5 log PFU/g，而鼠諾羅病毒經電漿處理 120秒，減少5 log PFU/g以上，並且對顏色測定或花青素濃度沒有顯著影響。

表2-2電漿技術應用於病毒失活

Table. 2-2 Inactivation of virus of plasma technology

Sample	Plasma	Working gas	Virus	Reference
Dental instruments	RF	Ar + O ₂	Prion protein	Whittaker <i>et. al.</i> , 2004
Adenoviruses in solution	DBD	Air	Adenoviruses	Zimmermann <i>et. al.</i> , 2011
Beef loins			Murine norovirus	
Chicken breasts	APPJ	N ₂	Avian influenza virus	Bae <i>et. al.</i> , 2015
Pork shoulder				
Vaccine	APPJ	Ar + O ₂ + N ₂	Newcastle disease virus	
			Avian influenza virus	Wang <i>et. al.</i> , 2016
Blueberries	APPJ	Air	Murine norovirus	
			Tulane virus	Lacombe <i>et. al.</i> , 2017

2.2.4 電漿失活病毒機制

電漿系統開啟時，氣體受到激發離子化並互相結合反應，產生電漿，而電漿衍生出的自由基為主要失活病毒的機制 (Wang *et. al.*, 2016)。

自由基可分為兩大類:活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 與活性氮 (Reactive nitrogen species, RNS)，其所涵蓋之種類眾多，又可分為自由基種類與非自由基種類，如氫氧自由基 ($\cdot\text{OH}$)、過氧化氫 (H_2O_2)、超氧游離基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、臭氧 (O_3)、單線態氧 (Singlet oxygen, $^1\text{O}_2$)、一氧化氮自由基 ($\text{NO}\cdot$) 等，如表2-3 (Chabot *et. al.*, 1998；梁，2006；廖等，2008)。

活性氧(ROS)所產生的臭氧，臭氧屬於具有強烈氧化能力的氣體會氧化病毒外的衣殼蛋白，使病毒核酸(DNA/RNA)裸露在外 (Predmore *et. al.* (b), 2015)；氫氧自由基 ($\cdot\text{OH}$) 破壞病毒核酸結構，造成核酸的斷裂或鹼基結構變化，使得核酸永久性的損傷，導致病毒無法複製，因此失活(梁，2006；廖等，2008；黎等，2008)。

活性氮(RNS)所產生的NO以及NO與其他自由基的交互作用，對核酸所造成的損傷，被認為是NO毒性作用的結果(Bartosz, 1996)，特別是NO與超氧化物陰離子反應產生過氧亞硝酸鹽(ONOO^-)，進而造成核酸斷裂 (Beckman *et. al.*, 1990)。

表2-3 活性氧類 (ROS) 與活性氮類 (RNS)

Table. 2-3 Reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS)

(資料來源 : Chabot *et. al.*, 1998)

	Free radicals		Nonradicals	
Reactive oxygen species	$O_2^{\bullet -}$	Superoxide	H_2O_2	Hydrogen peroxide
	$\bullet OH$	Hydroxyl	$HOCl$	Hypochlorous acid
	RO_2^{\bullet}	Peroxyl	O_3	Ozone
	RO^{\bullet}	Alkoxy	1O_2	Singlet oxygen
	HO_2^{\bullet}	Hydroperoxyl	$ROOH$	Hydroperoxide
Reactive nitrogen species	NO^{\bullet}	Nitric oxide	$ONOO^-$	Peroxynitrite
	NO_2^{\bullet}	Nitrogen dioxide	NO_2^+	Nitronium cation
			NO^+	Nitrosyl cation
			$ROONO$	Alkyl peroxynitrite



2.3 生魚片

2.3.1 生魚片產品特性與種類

生魚片好壞之關鍵在於鮮度。日本用來製作生魚片之魚種，一旦被捕獲後，立刻用刀子叉入其大動脈，讓血流出，因此白肉魚生魚片潔白無暇(洪，1997)。可供為生魚片之魚種以鮭魚、旗魚、紅魷、鮪魚、海鱺等較常見，另外金槍魚、鰹魚、鯽魚、油魚、鯖魚、鱈魚、紅魷、油魚、河豚、海鱸魚、鰻魚、比目魚、竹夾魚、嘉臘魚等魚類以及烏賊、章魚、花枝(烏賊)、蝦、貝類都能做為生魚片食用，經市場抽調結果，台灣地區生魚片流通業者最常供應之魚種依序為鮭魚(77%)、旗魚(74%)、紅魷魚(72%)及鮪魚(71%)(洪，1997；林，2002)。由於鮭魚生魚片為最常供應之魚種，因此本研究針對鮭魚生魚片最為主要樣品。

2.3.2 鮭魚

屬於鮭目之鮭亞目，包括鮭魚與鱒魚等重要垂釣與經濟性魚種，適合各種烹調食用法，包括生魚片、煙燻、烤、清蒸、煮湯等，如：麥奇鈎吻鮭(虹鱒)，學名：*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)(圖 2-3)，原產於太平洋岸之北美洲及勘察加半島與大西洋鮭魚，學名：*Salmo salar* Linnaeus 1758 (圖 2-4)，廣泛分布於北大西洋溫寒帶海域(邵等，1996)。

2.3.3 生魚片加工方法

生魚片加工有二種方法(1)此方法普遍用於養殖漁業，如潮鯛(台灣鯛):先將原料魚驗收，選取合適的魚後，拿去冰鎮，放血、剖腹、去頭、切片、去皮及修整魚片等流程，再浸泡鹽水賦予魚片鹹味及浸泡臭氣水進行殺菌，浸泡完後拭乾，利用一氧化碳或抗氧化劑保持魚肉的鮮紅色色澤，最後進行真空包裝、冷凍作業、裝箱、儲藏及出貨，如圖 2-5 所示；(2) 此方法普遍用於遠洋漁業，如鮪魚:漁船捕撈後，放血，並去鰓、鰭及內臟，去除完進行洗滌、急速凍結、包冰，之後凍藏至超低溫(-55°C)，接著從漁船卸貨至工廠，進行電鋸切割(去頭、魚體縱切、脊椎骨去除)，刨去血合肉，魚肉切成魚片，最後包裝，如圖 2-6 所示 (林等，2009)。

2.3.4 病毒之危害

諾羅病毒 (Norovirus) 常被發現與水產食品有關 (Martinez *et. al.*, 2005)。諾羅病毒造成許多食物中毒案例，且每年其比率逐年增加，也因為攝入遭受病毒感染生魚片之事件進而產生，其中 2016 年底，日本發生諾羅病毒大流行事件，根據日本國立感染症研究所表示，諾羅病毒單週感染人數破 6 萬例，創下 10 年來新高，衛生福利部疾病管制屬呼籲赴日少吃生魚片。



圖 2-3 麥奇鈎吻鮭 (虹鱒)

Fig.2-3 *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)

(圖片來源：邵等，1996)



圖 2-4 大西洋鮭魚

Fig.2-4 *Salmo salar* Linnaeus 1758

(圖片來源：邵等，1996)

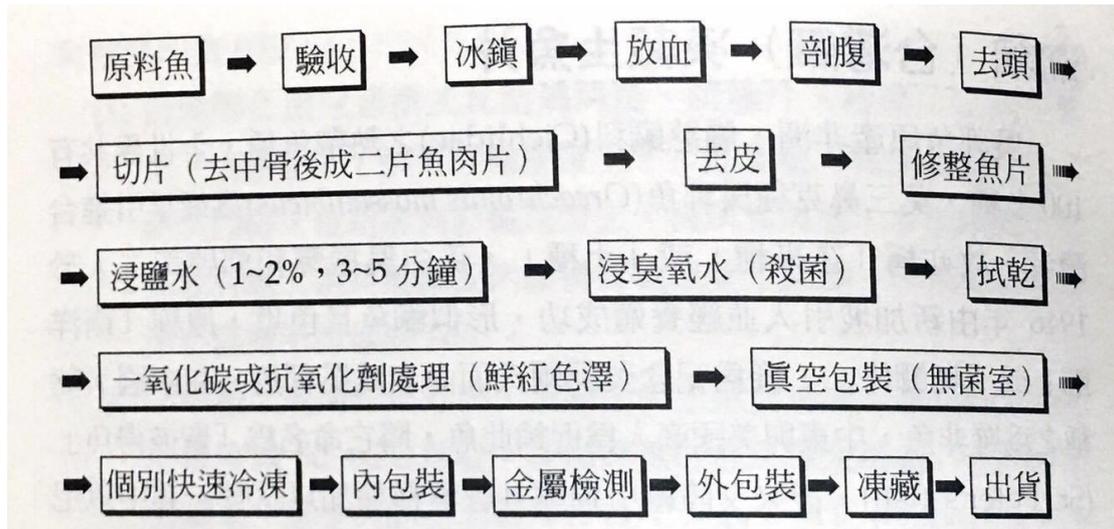


圖 2-5 潮鯛生魚片之製造流程

Fig.2-5 Operation procedures of tilapia sashimi

(資料來源：林等，2009)

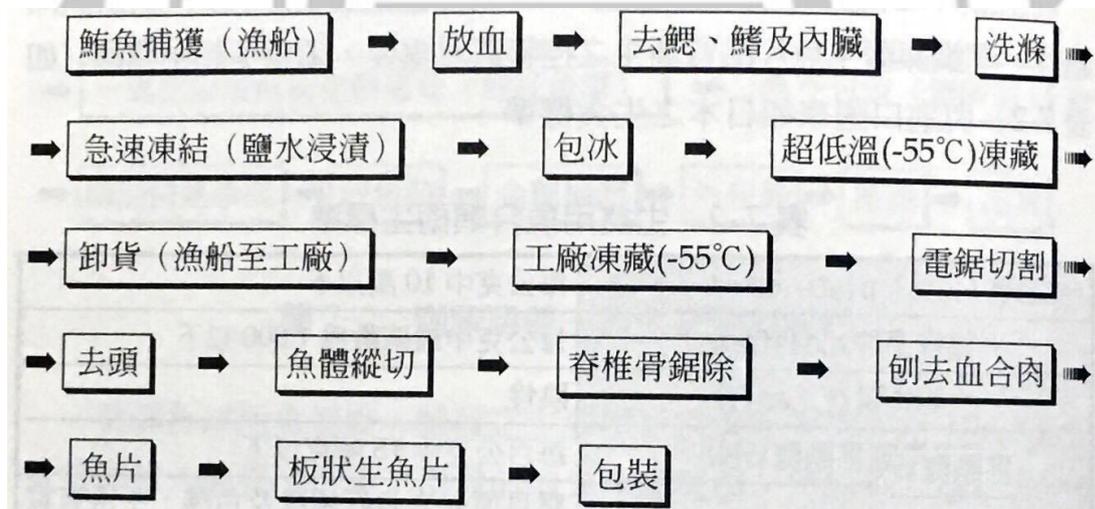


圖 2-6 鮪魚生魚片之處理流程

Fig.2-6 Operation procedures of tuna sashimi

(資料來源：林等，2009)

第三章 材料與方法

3.1 實驗材料與儀器

3.1.1 諾羅病毒

諾羅病毒第二型 (Norovirus GII) (東海大學環境科學與工程系環境分子生物實驗室，台中，台灣)。採集樣本為東海大學宿舍民生廢水(CWW)及薄膜生物處理之回收水(RCW)之混合樣品，並且，使用美國環保署公布濃縮病毒方法，以 1MDS 濾膜吸附病毒洗脫 (Viradel)方法採集 (林，2016)。

3.1.2 標準品製備

將質體 (*Escherichia coli* DH5 α competent cell) (東海大學環境科學與工程系環境分子生物實驗室，台中，台灣) 以 5mL LB Broth，在 37°C 培養 16-18 小時，以市售 Gene-Spin™ Miniprep Plasmid Purification Kit 抽取質體 DNA。本流程一律以 12000 \times g 離心；首先取 1.3mL 菌液置於離心管離心 1 分鐘後，去除上清液，加入 200 μ l Solution I (50 mM glucose, 25mM Tris-HCL, 10 mM EDTA)與沉澱物震盪混合，接著加入 200 μ l Solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS)，並翻轉離心管 5 次後，再加入 200 μ l Solution III (3M sodiumacetate)，再翻轉 5 次，離心 1 分鐘之後，先組合「Spin column」和「Collection tube」，將離心上清液移至「Spin column」離心並倒出「Collection tube」中濾液，

加入 700 μ l 「Wash Solution」並離心，倒出「Collection tube」中濾液，此步驟做兩次，接著再空轉離心 3 分鐘，去除殘留液，將「Spin column」移入新的「Collection tube」，60 $^{\circ}$ C 培養，10 分鐘，加入 100 μ l 的「Elution Solution」靜置 2 分鐘後離心，保留「Collection tube」中 DNA 流出液，並存放-20 $^{\circ}$ C 中。

使用 Nanodrop 分光光度儀在 260nm 波長下吸光值測量上步驟所抽取質體 DNA，換算成質體濃度(ng/ μ l)，再轉換成每單位體積之 copies 數 (林，2016)，如下述：

$$\frac{c\left(\frac{ng}{\mu l}\right) \times 6.022 \times 10^{23} \left(\frac{copies}{mole}\right)}{2950(bps) \times 10^9 \left(\frac{1}{n}\right) \times 660 \left(\frac{g}{mole \times bps}\right)}$$

- C 為分光光度計波長 260 nm 所測得質體濃度。
- 6.022×10^{23} 為 1M 濃度下的理想病毒 copies 數。
- 2950 bps 為所使用載體長度 2728 bps 加上所連接上的 PCR 產物 bps 共 2950bps。
- 10^9 為因次換算，而 660 (g/mole \times bps) 為 DNA 每一個核苷酸的平均分子量。

將所製備質體濃度換算約有 10^9 (copies/ μ l)，將此濃度稀釋成 5×10^8 (copies/ μ l)，並以連續 10 倍稀釋得 5×10^n ，n=2-8 之濃度梯度標準液，存於-20 $^{\circ}$ C。

3.1.3 實驗樣品與製備

從網路平台爭鮮 GOGO 購買挪威鮭魚肚 (生食級) (爭鮮股份有限公司, 桃園, 台灣)。樣品處理的方法參考 Bae 等人(2015), 並稍微修改, 樣品在接病毒前, 先將樣品放置無菌操作台裡, 使用無菌的不鏽鋼刀均勻切割成 $5.0 \times 2.0 \times 1.0 \text{ cm}^3$, 重量約 $10 \pm 1 \text{ g}$ 。將樣品轉移到無菌培養皿, 取 $100 \mu\text{L}$ 病毒懸浮液接種在樣品表面上, 震盪 1 分鐘, 使病毒懸浮液擴散至整片生魚片, 且均勻分佈。以使病毒附著於生魚片, 將樣品裝進培養皿內密封, 置於冰箱中, 冷藏 10 分鐘後, 並立即用於實驗。

3.1.4 實驗試藥

1. Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Difco laboratories, Detroit MI, USA)。
2. Gene-Spin™ Miniprep Plasmid Purification Kit (Protech Technology, 台北, 台灣)。
3. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, CA, USA)。
4. ZR Viral RNA Kit™ (ZYMO RESERCH, Irvine, CA, USA)。
5. ABI Prism® Univer qPCR Kit, whit KAPA (Applied Biosystems, MA, USA)。
6. 氫氧化鈉 (sodium hydroxide, pellet, NaOH) (MACRON, PA, USA)。

7. 無水磷酸氫二鈉(sodium phosphate dibasic anhydrous, Na_2HPO_4) (Shimakyu's Pure Chemicals, Osaka, Japan)。
8. 磷酸二氫鉀(potassium phosphate monobasic, KH_2PO_4) (Shimakyu's Pure Chemicals, Osaka, Japan)。
9. 聚乙二醇 6000(polyethylene glycol, PEG#6000) (Shimakyu's Pure Chemicals, Osaka, Japan)。
10. 氯仿(chloroform, CHCl_3) (台灣默克股份有限公司，台北，台灣)。
11. 丁純 (n-Butyl Alcohol, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$) (Shimakyu's Pure Chemicals, Osaka, Japan)。
12. 氯化鈉(sodium chloride, NaCl) (J.T.Baker, PA, USA)。
13. 鹽酸(hydrochloric acid, HCl) (聯工化學廠，新竹，台灣)。
14. 1.1.3.3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3-Tetraethoxypropane) (友和貿易股份有限公司，新北，台灣)。
15. TBA 試劑(2-Thiobarbituric acid, minimum 98%) (Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, USA)。
16. 聚矽銅油(silicone oil) (聯工化學廠，新竹，台灣)。

3.1.5 儀器設備

電漿系統

1. 低溫常壓電漿控制器 (暉盛科技股份有限公司, 台南, 台灣)。
2. 低溫常壓電漿噴嘴模組 (暉盛科技股份有限公司, 台南, 台灣)。
3. 可調式低溫常壓電漿操作平台 (暉盛科技股份有限公司, 台南, 台灣)。

其他儀器設備

1. RT-PCR (Mycycler Thermal cycle PCR, Bio-rad, NV, USA)。
2. StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA)。
3. 低溫恆溫培養箱 (KK04-498, SANYO, Tokyo, Japan)。
4. 高壓滅菌鍋 (TM-328, Tomin, 新北, 台灣)。
5. 均質機 (ULTRA-TURRAX T25, IKA® -Labortechnik, Germany)。
6. 色差儀 (ZE 2000, 基進儀器股份有限公司, 新北, 台灣)。
7. 物性測定儀 (TA.XT plus, 超技儀器股份有限公司, 新北, 台灣)。
8. 漩渦混合器 (AWE-H70111, DragonLab, 新北, 台灣)。
9. 標準型電子天平 (XS-6250C, Precise Industries, Ltd., Switzerland)。
10. 微量冷凍離心機 (CF-15R, Hitachi, Japan)。
11. 微量吸管 (Model P10、P20、P100、P1000, Gilson Pipetman, CT,

USA)。

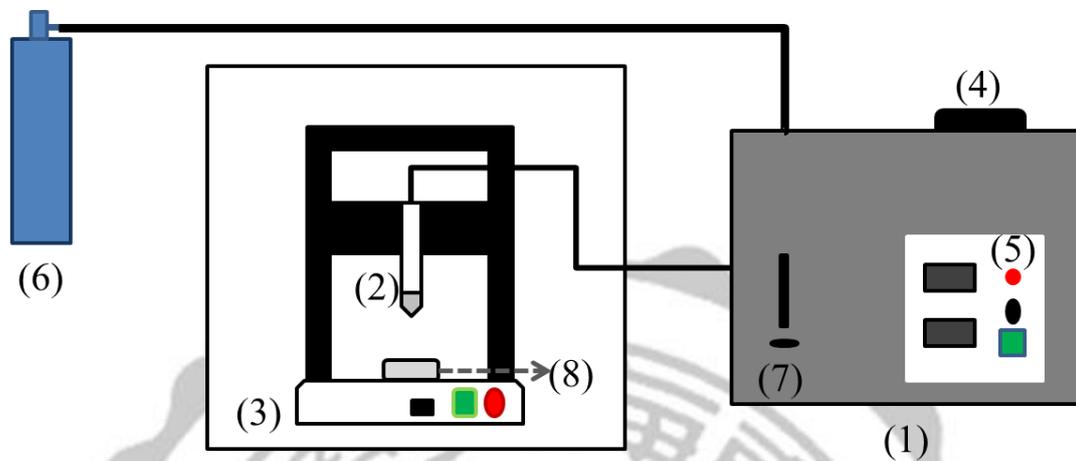
12. 酸鹼度測定儀 (InfoLad pH Level 1, 上泰儀器股份有限公司, 台中, 台灣)。
13. 分光光度計 (Genesys 10-S, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。
14. 氮氣鋼瓶(nitrogen, N₂) (東洋氣體有限公司, 台中, 台灣)。
15. 空氣鋼瓶(air) (東洋氣體有限公司, 台中, 台灣)。
16. 氧氣鋼瓶(oxygen, O₂) (東洋氣體有限公司, 台中, 台灣)。



電漿系統建立

本研究使用常壓非熱噴射式電漿(non-thermal atmospheric plasma jet)，系統主要分為三大部分 1. 可調式低溫常壓電漿操作平台(含 Teach Pendant 教導盒及 XYZ 座標移動軸) 2. 低溫常壓電漿噴嘴模組(含噴嘴) 3. 低溫常壓電漿控制器(含電源供應器、調壓器、增幅器、電流穩定器、流量控制器與氣體鋼瓶)。電漿系統示意圖如圖 3-1 所示。

首先使用可調式低溫常壓電漿操作平台的 Teach Pendant 教導盒設定 XY 座標移動軸，以矩形(55 mm × 55 mm)之範圍進行移動，之後設定 Z 軸，調整低溫常壓電漿噴嘴模組，將噴嘴與樣品間距 1 cm，噴嘴孔徑為 4 mm，移動速度 30 mm/sec，操作平台的門關上，形成一個反應腔；開啟氣體鋼瓶(空氣、氧氣及氮氣)，氣體流進流量控制器，控制氣體流量為 15 L/min，以台灣電力公司所提供電壓(220V)供電給低溫常壓電漿控制器，藉由電壓控制器調壓器調整電壓(180V)再經增幅器增幅至線流穩定器穩定電流，之後電流與氣體傳輸至噴嘴開始放電，通入電流與氣體的噴嘴會噴出離子化氣體產生電漿。



- | | |
|------------------|----------|
| 1. 低溫常壓電漿控制器 | 5. 增幅器 |
| 2. 低溫常壓電漿噴嘴模組 | 6. 氣體鋼瓶 |
| 3. 可調式低溫常壓電漿操作平台 | 7. 氣流控制器 |
| 4. 調壓器 | 8. 樣品放置處 |

圖 3-1 常壓非熱噴射式電漿系統組成示意圖

Fig. 3-1 Design of non-thermal atmospheric plasma jet generating device



圖 3-2 常壓非熱噴射式電漿設備實體圖

Fig. 3-2 Picture of non-thermal atmospheric plasma jet equipment

3.2 實驗架構

本研究主要以常壓非熱噴射式電漿探討三種工作氣體（空氣、氧氣及氮氣），對諾羅病毒失活效果以及電漿處理是否對鮭魚生魚片品質之影響，而品質檢測包括：脂質氧化、pH 值、顏色測定及質地分析。

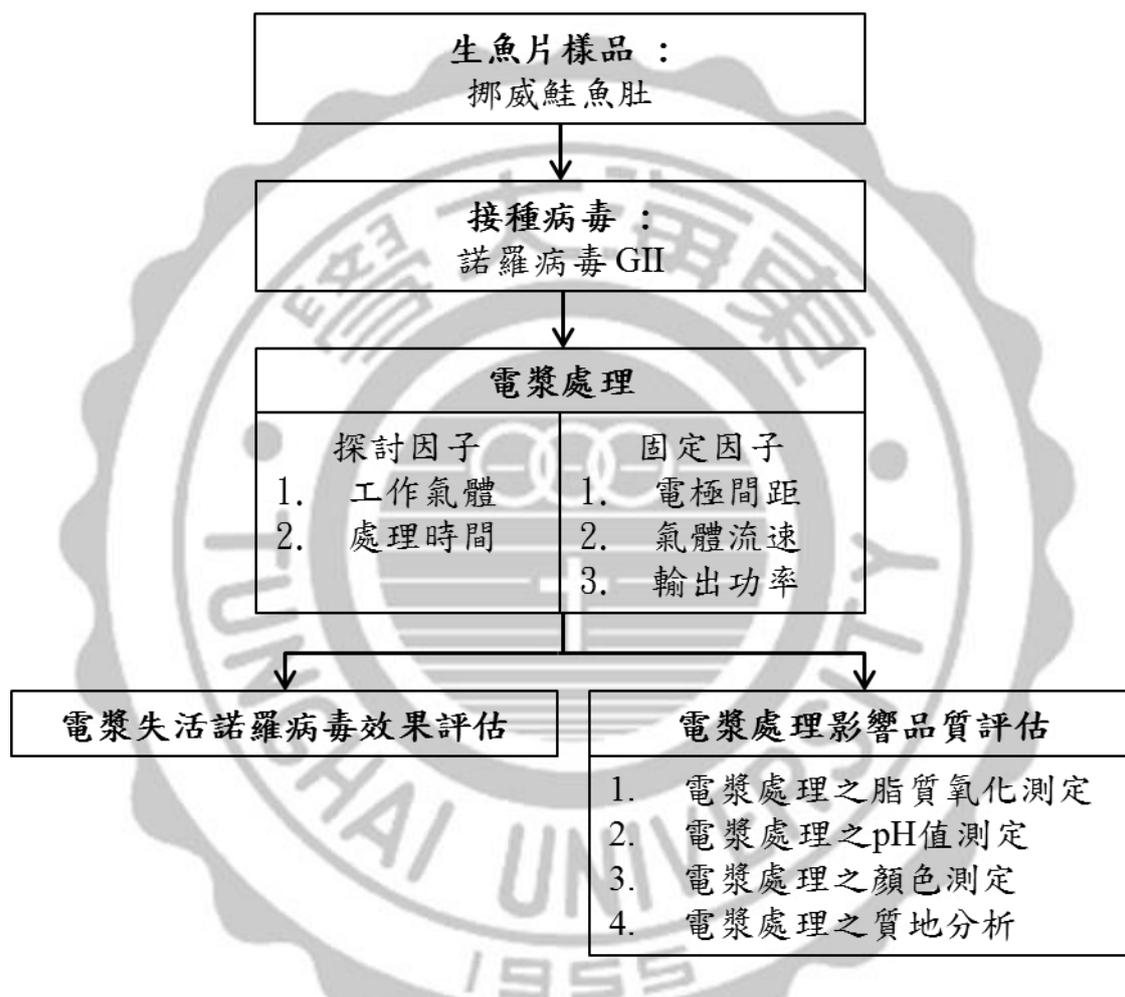


圖 3-3 實驗架構

Fig. 3-3 Flowchart of the research

3.3 電漿處理

實驗進行前，先將電壓、電極間距及通入氣體流量設定好，之後開啟電漿系統，樣品為鮭魚生魚片。本研究使用電漿機器為常壓非熱噴射式電漿，電壓 180V、電極間距 1 公分、氣體流速 15 L/min、工作氣體分別為空氣、氧氣及氮氣與不同的處理時間分別為 0、3、6、9、12 分鐘，探討不同工作氣體，對諾羅病毒失活效果之影響以及評估電漿處理時間，對鮭魚生魚片品質之影響。實驗流程如圖 3-4 所示。

3.4 諾羅病毒之檢測

本研究參考衛生福利部公告辦法，部授食字第 1031900867 號公告修正與 Scherer 等人(2010)進行諾羅病毒檢測。實驗流程如圖 3-5 所示。

3.4.1 鮭魚生魚片前處理

首先取 1.5g 鮭魚生魚片，置於 50ml 離心管，加入 10ml 磷酸鹽緩衝溶液，將離心管置於冰上，以均質棒進行 2 段式研磨，每段各 30 秒；續加入 6ml 氯仿-丁醇溶液，持續均質 30 秒，再以 3ml 磷酸鹽緩衝溶液沖洗殘留於均質棒上之檢體。將研磨後之檢體於 4°C 旋轉混合均勻 1 小時，以轉速 12000×g 離心 20 分鐘，取上層液 (衛生福利部食品藥物管制署，2013)。

3.4.2 病毒濃縮液

將 3.4.1 節上層液中加入 10.5ml PEG6000-氯化鈉溶液，充分混勻，混合於 4°C 持續旋轉混合均勻過夜。混合液於 4°C 以 12000×g 以上之轉速進行離心 20 分鐘，去除上清液，續以市售 ZR Viral RNA Kit™ 萃取病毒 RNA (衛生福利部食品藥物管制署，2013)。

3.4.3 RNA 病毒核酸萃取

本研究以市售 ZR Viral RNA Kit™ (ZR Viral RNA Buffer、RNA Wash Buffer、DNase/RNase-Free Water、Zymo-Spin™ IC Columns、Collection Tubes、DNase/RNase-Free Tubes、Instruction Manual, USA) 萃取病毒 RNA，實驗前先將 ZR Viral RNA Buffer 加入 β-mercaptoethanol 破壞雙硫鍵，使最終濃度為 0.5 % (v/v)；另外在 RNA Wash Buffer 加入乙醇，使 RNA 便於沉澱。一開始取 200 μl 之病毒濃縮液與 600 μl ZR Viral RNA Buffer 在 1.5 mL 組裝完成的「IC Column」和「Collection tube」之離心管，手搖晃翻轉混合 2 分鐘破壞病毒蛋白質外殼，以 12000 ×g 離心倒掉「Collection tube」中濾液，之後加入「RNA Wash Buffer」300 μl，再以 12000 ×g 離心倒掉「Collection tube」中濾液，此步驟需做兩次，最後再裝上「Collection tube」以 12000 ×g 離心一次後，加入 15 μl 「DNase/RNase Free Water」12000 ×g 離心，取離心後流出的 RNA 溶液，立即進行反轉錄。

3.4.4 反轉錄反應

RNA 通常以單股的形式存在，容易被核糖核酸酶(RNase)分解，因此轉換為穩定型態的 DNA(cDNA)。使用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits 執行反轉錄，依下列配置混合液：

Virus RNA Solution.....	10 µl
10X RT Buffer.....	2 µl
10X Random Primer.....	2 µl
Reverse Transcriptase.....	0.25 µl
25X dNTP Mix (100nm).....	0.8 µl
DNase/RNase Free Water.....	4.95 µl
Total volume.....	20 µl

混合液配置完成後，依表 3-1 進行反轉錄反應，反應完畢後，此時為 cDNA 產物，並即時病毒量化分析。

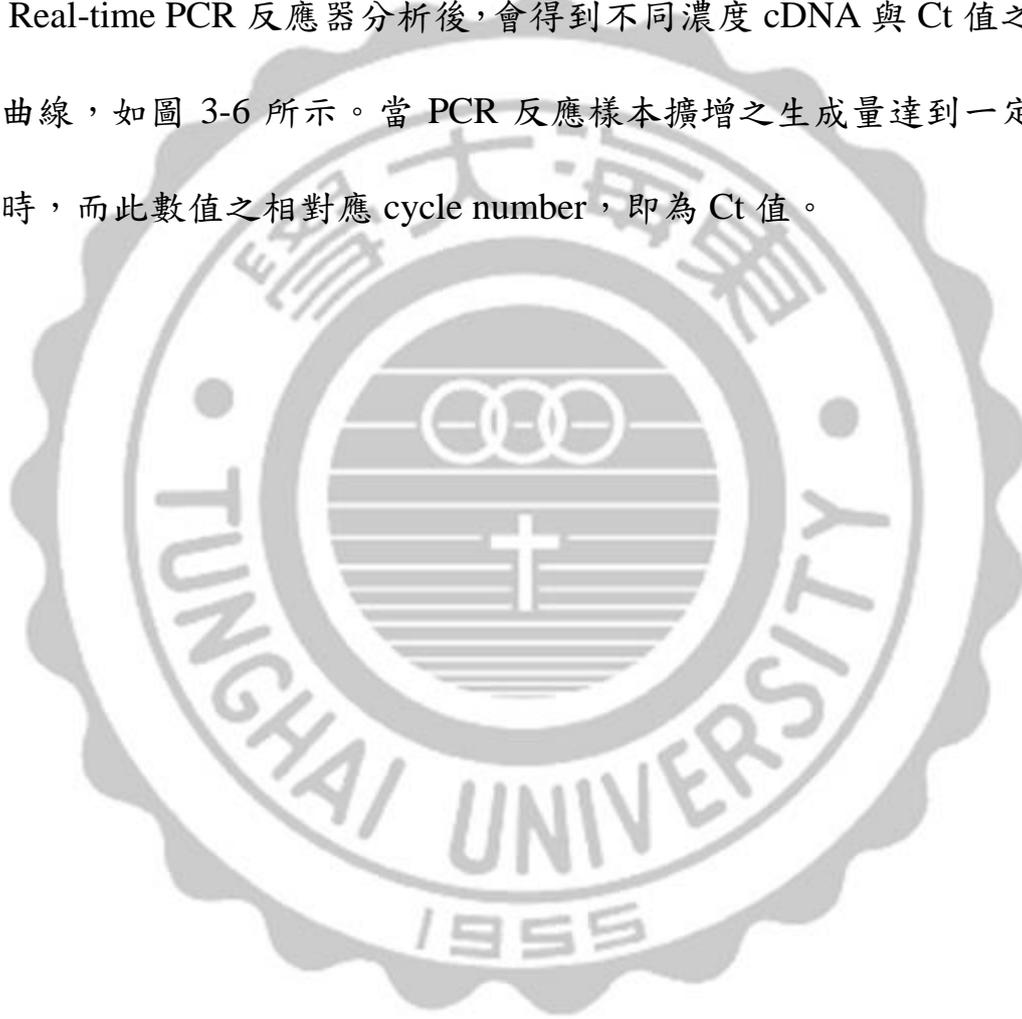
3.4.5 諾羅病毒量化分析

探針黏合位子介於 Forward 與 Reverse 引子之間，而帶有螢光訊號的探針會在 PCR 擴增中，一起被釋放出來，此時利用螢光偵測儀分析螢光訊號的數量。本研究使用 StepOne™ Real-Time PCR 系統執行量化分析，依下列配置混合液：

ABI Prism® Univer qPCR Kit.....	5 µl
10 mM Forward.....	0.5 µl
10 mM Reverse.....	0.5 µl
Probe.....	0.3 µl
DNase/RNase Free Water.....	1.7 µl
cDNA.....	2 µl
Total volume.....	10 µl

針對諾羅病毒樣品定量，所使用探針與引子如表 3-2，將配置好藥劑的樣品溶液置入 Real-Time PCR 反應器 StepOne™ Real-Time PCR 系統執行溫度調控，如表 3-3。

檢量線藥品配置方法與 3.4.5 節相同，不同濃度的標準品(cDNA)經 Real-time PCR 反應器分析後，會得到不同濃度 cDNA 與 Ct 值之標準曲線，如圖 3-6 所示。當 PCR 反應樣本擴增之生成量達到一定數值時，而此數值之相對應 cycle number，即為 Ct 值。



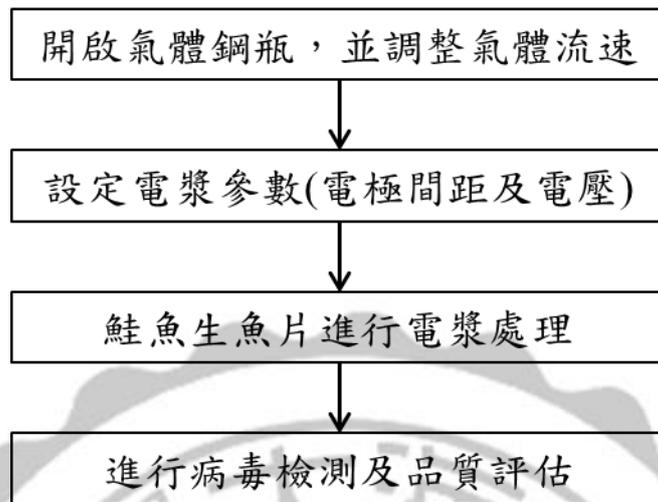


圖 3-4 電漿處理鮭魚生魚片之流程圖

Fig. 3-4 Operation procedures of test of plasma of salmon sashimi

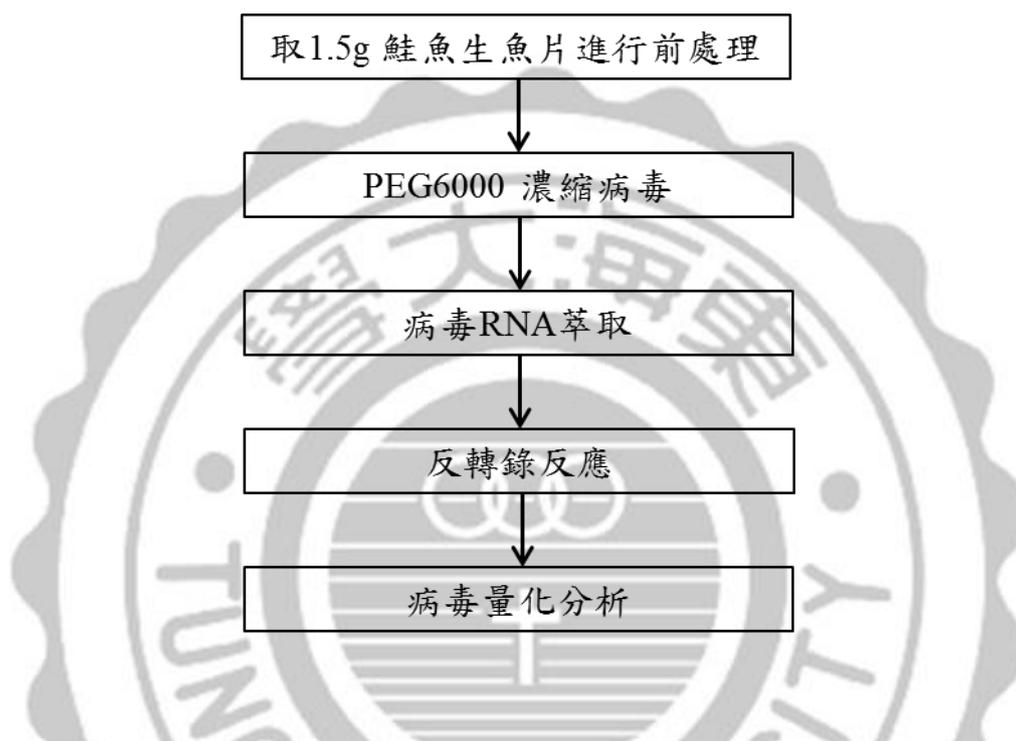


圖 3-5 諾羅病毒檢測之流程圖

Fig. 3-5 Operation procedures of test of norovirus

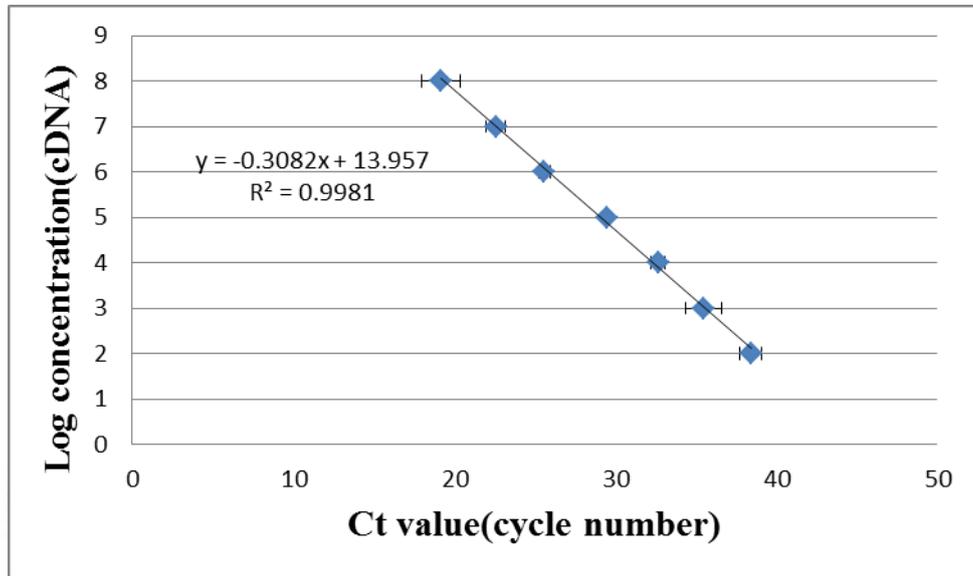


圖 3-6 諾羅病毒 G II 標準品濃度檢量線

Fig. 3-6 The calibration curve of norovirus G II

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

表3-1 反轉錄

Table. 3-1 Reverse transcription

步驟	溫度(°C)	時間(min)
反轉錄	25	10
	37	120
	85	5
	4	∞

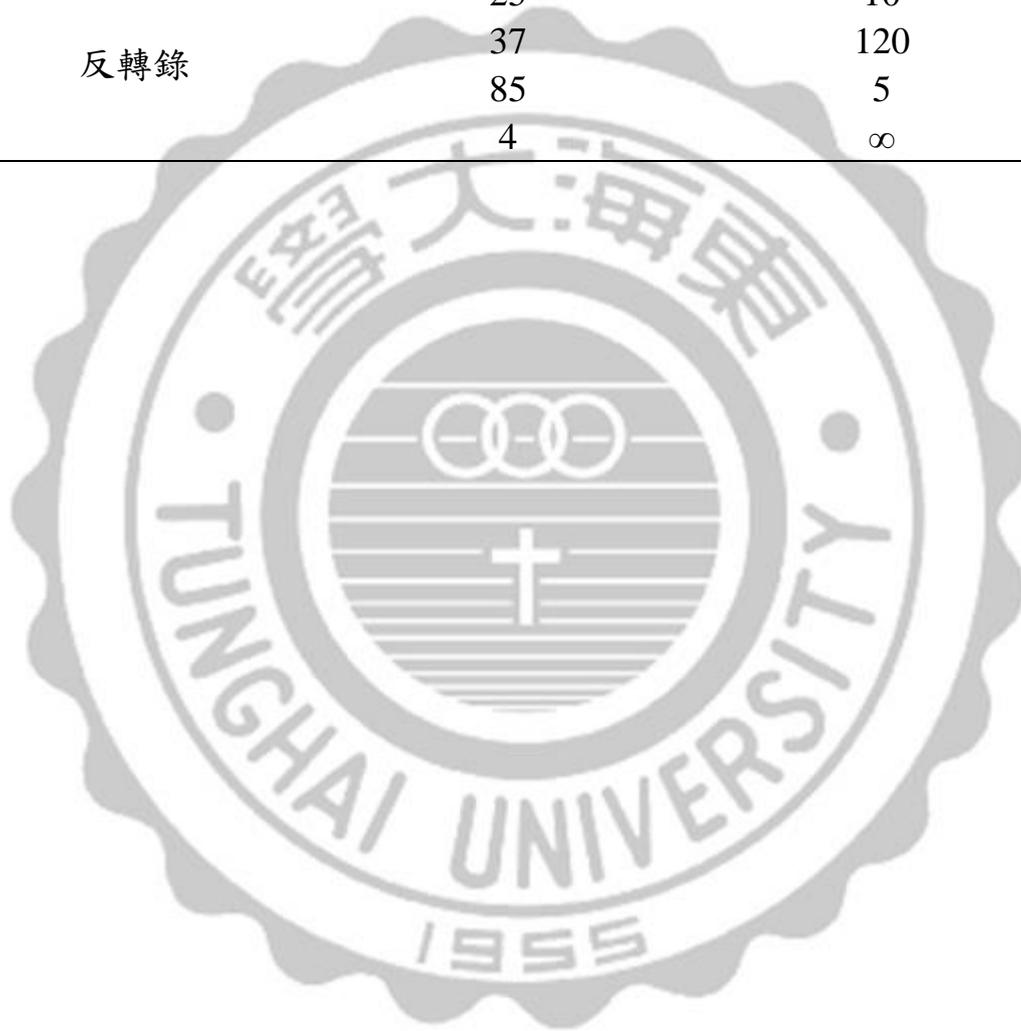


表3-2 本研究對諾羅病毒第二型所使用的引子

Table. 3-2 Norovirus GII primers in the study

Virus	Primers	Sequence	Expected size (bps)	Target region	Annealing temperature(°C)	Reference
No V gii	Forward					林，2016
	No-V gii-f1	gCCAAATTcAgATggATgAg				
	No-V gii-f2	CCAAATgTTCAGgTggATgAg				
	No-V gii-f3	CCATgTTCAGgTggATgAg	96	RdRp	59.5	
	Reverse					
	No-V gii-r	TTCgACgCCCACTTCATTCACA				
	Probe					
	No-V gii-p	VIC-TTgCgATCgCCCTCCCCACgTgCT-BHQ				

表3-3 Real-Time PCR調控溫度梯度

Table. 3-3 Control the temperature gradient of Real-Time PCR

步驟	溫度(°C)	時間
1. 最初變性	50	2 min
2. 變性	95	15 sec
3. 黏接	59.5	30 sec
4. 延展	72	15 sec
(步驟 2-4, 共進行 45 個循環反應)		
5. 最後延展	72	15 sec

3.5 電漿處理對鮭魚生魚片品質測定

3.5.1 脂質氧化酸敗測定

本研究參考鄭(2010)、María(2013)等人與陳(2013)，測定食品中硫巴比妥酸價(TBARS)之測定，其原理為脂質的酸敗生成物與硫巴比妥酸(Thiobarbituric acid，簡稱 TBA)作用，生成紅色色素(TBARS)，可用比色法定量。紅色色素為丙二醛(Malonaldehyde，簡稱 MDA)和 TBA 的縮合物，如圖 3-7 所示。TBA 色素在 532 nm 有吸光，故將反應生成物於 532 nm 測其吸光值，吸光值愈強，酸敗生成物(MDA)含量愈高。實驗流程如圖 3-8 所示。

1. 丙二醛之檢量線製作

1,1,3,3-四乙氧基丙烷各取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 及蒸餾水分別置 50 mL 定量瓶，並各加蒸餾水至標線混合均勻，製作標準溶液，將不同濃度標準液分別置入一系列 5 支試管中，加入定量 TBA 試劑各 3mL，混合均勻，置沸水浴加熱 30 分鐘，取出置於室溫中，測 532 nm 之吸光值，由所得吸光值及不同濃度標準溶液之丙二醛含量繪檢量線。

2. 樣品中硫巴比妥酸價檢測

精稱鮭魚生魚片 10g，切碎置入蒸餾瓶中加入 0.1 N HCl 100 mL 及數滴消泡劑，以溫火加熱並收集餾出液 35 mL，加入蒸餾水定容至

50 mL，供做檢液。各取 3 mL 檢液與 TBA 試劑混合均勻，置沸水浴加熱 30 分鐘取出置於室溫，測 532 nm 之吸光度。

3.5.2 pH 值

本研究參考邱和丁(2005)，Fernánde 等人(2009)、李等人(2011)與 Chang 等人(2012)，取 5g 鮭魚生魚片加入 45 mL 的蒸餾水均質，該溶液進行離心後，取其上清液測定其 pH 值即可。實驗流程如圖 3-9 所示。

3.5.3 顏色測定

本研究參考許多文獻(葉, 2014; Bae *et. al.*, 2015; Kang *et. al.*, 2016)所使用的國際照明委員會 (International Commission on Illumination, CIE) 建立的 Lab 色彩空間，該系統為國際通用的色差標準，適用於一切物體色或光源色的表示。實驗流程如圖 3-10 所示。CIE Lab 色彩空間以 L 值表示明暗度(100-0)、a 值表示顏色測定的紅(+)/綠(-)、b 值表示顏色測定的黃(+)/藍(-)，如圖 3-11 所示。將色差儀測量出來的 L 值、a 值與 b 值，利用 CIELAB 色彩空間之色差公式，計算色差值 (ΔE)，色差公式定義如下式：

$$\Delta E = [(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2]^{1/2}$$

3.5.4 質地分析

依據食品物性學的基本原理，物性測定儀所檢測之數據，用以客觀評價食品物性品質，透過物性測定儀分析，可以將人咀嚼食品的感覺用圖形和具體的數據表示出來。依據這些數據，進一步對樣品進行品質分類、品質控制和生產的優化。

利用指壓法進行肉質質地的判別，是最常使用於工業的方法，但此種方法會因為個人主觀，而有所不同；然而魚肉的質地能透過物性儀進行較為客觀的測試；主要分為擠壓、穿刺、剪切及延展，而二次擠壓可藉由力與時間的曲線圖進行質地輪廓分析(Texture profile analysis, TPA)，經由 TPA 檢測圖可得知硬度(Hardness)、聚合性(Cohesiveness)、膠黏性(Adhesiveness)、黏性(Gumminess)、彈性(Springiness)、脆度(Fracturability)之參數，如圖 3-12 所示 (Juliano, 1985；翁，2011；陳，2016)。

本研究參考翁(2011)與 Chang(2012)等人測試生魚片質地分析時，以量測硬度及彈性作為主參考變化因子，因此本研究，針對上述特性分別進行測試，而會針對這兩種特性是因為對魚類而言，肉質的彈性和緊實感是品質的指標之一，若是呈現軟爛的口感，會給人不新鮮的觀感。使用物性測定儀對鮭魚生魚片進行壓縮試驗(Compression test)，探頭(Probe)使用 P/36R，直徑 5 公分之擠壓伸縮載具，下壓速度為 5

mm/sec，下壓變形 50%，如表 3-4 所示。由二次擠壓，測得硬度 (Hardness, N)與彈性(Springiness, %)。實驗流程如圖 3-13 所示。

3.6 統計分析

本研究以 SAS 9.4 (Statistical Analysis System 9.4)軟體系統統計分析，計算平均值標準偏差，以 Duncan's test 進行事後檢定，比較各試驗平均值之差異程度，統計結果 $P < 0.05$ 時，代表有顯著差異。



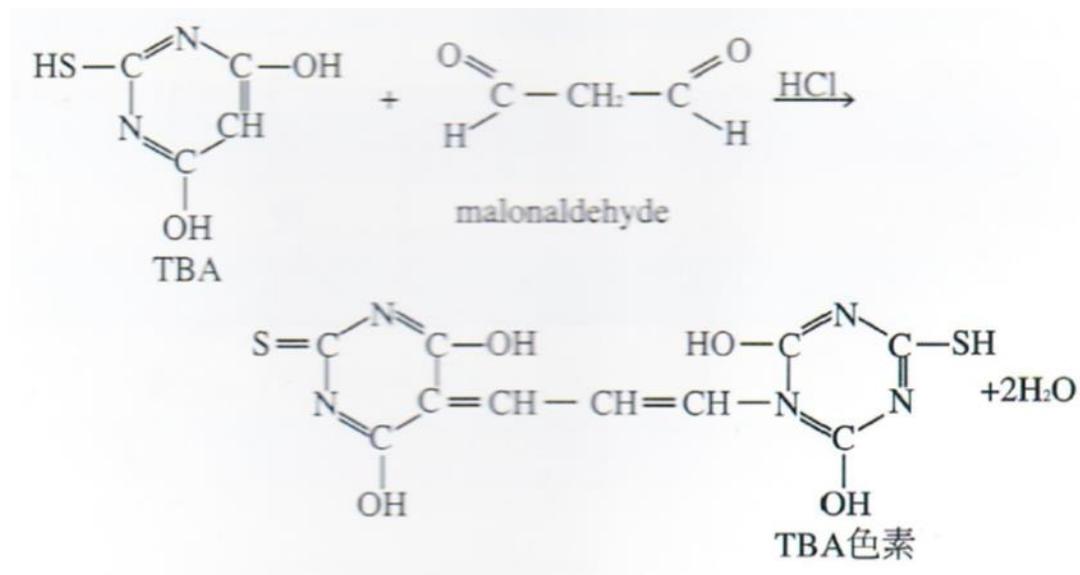


圖 3-7 Malonaldehyde 和 TBA 的縮合物

Fig. 3-7 Condensate of Malonaldehyde and TBA

(圖片來源：鄭，2010)



圖 3-8 硫巴比妥酸價之流程圖

Fig.3-8 The procedures of determining the acid value of sulfur barbital

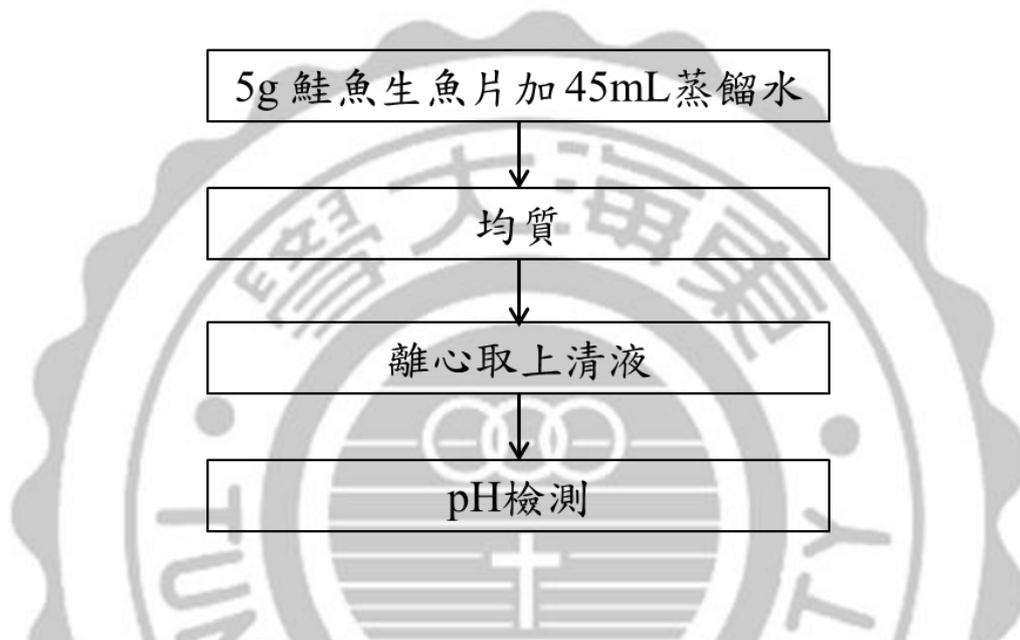


圖 3-9 pH 檢測之流程圖

Fig.3-9 The procedures of test of pH

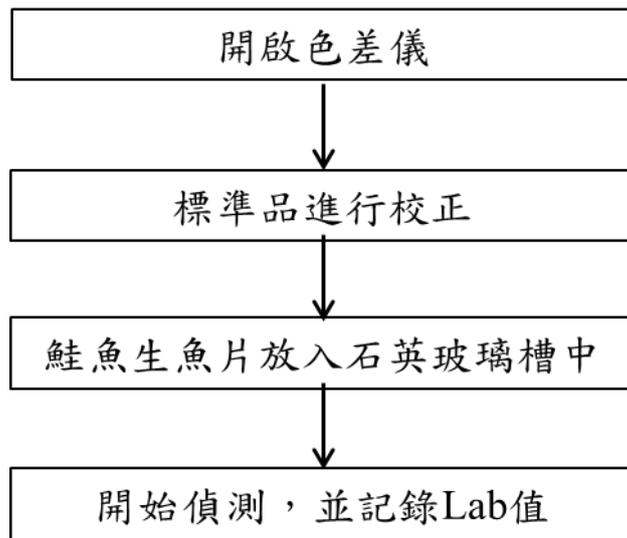


圖 3-10 顏色測定之流程圖

Fig. 3-10 The procedures of color measurement



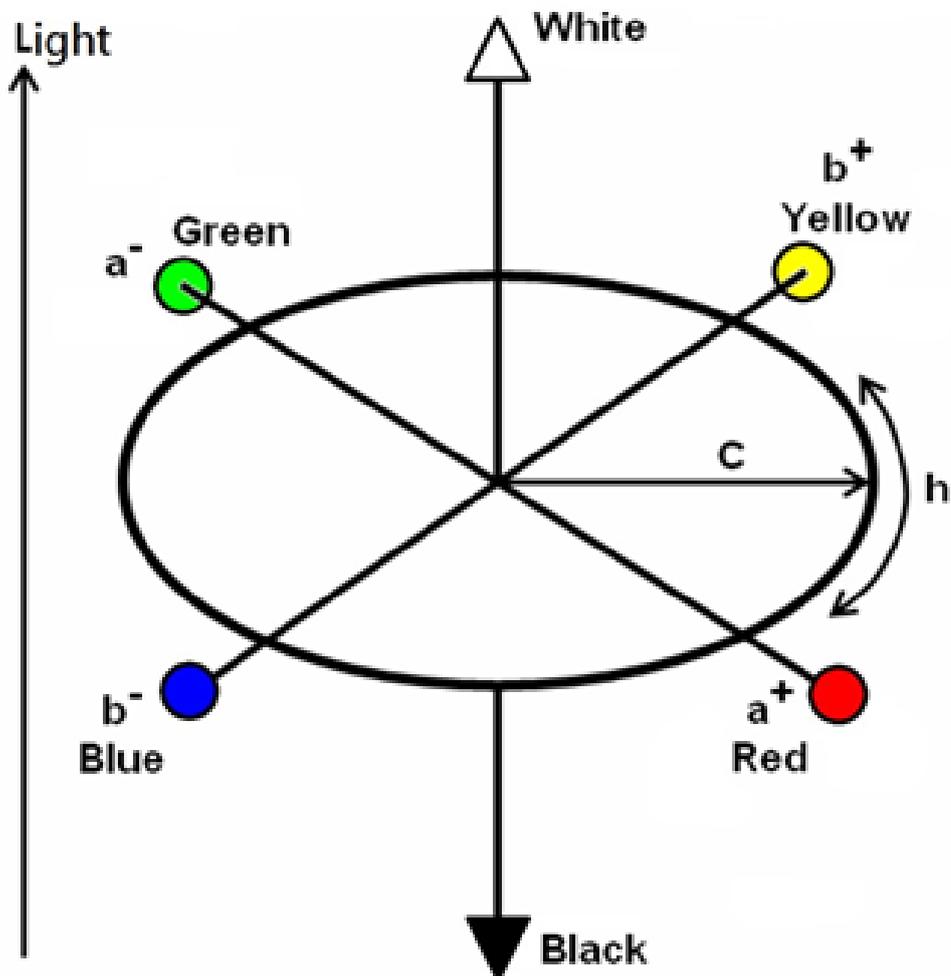


圖 3-11 CIELAB 色彩空間

Fig. 3-11 CIELAB color space

(圖片來源：葉，2014)

表3-4 擠壓測試參數設定與探頭規格

Table. 3-4 Test setting and probe of compression test

Compression test	
Test setting	Pre-test speed : 5 mm/sec Test speed : 5 mm/sec Post-test : 5 mm/sec Strain : 50 %
Probe	Model : P/36R Diameter : 5 cm
Picture	

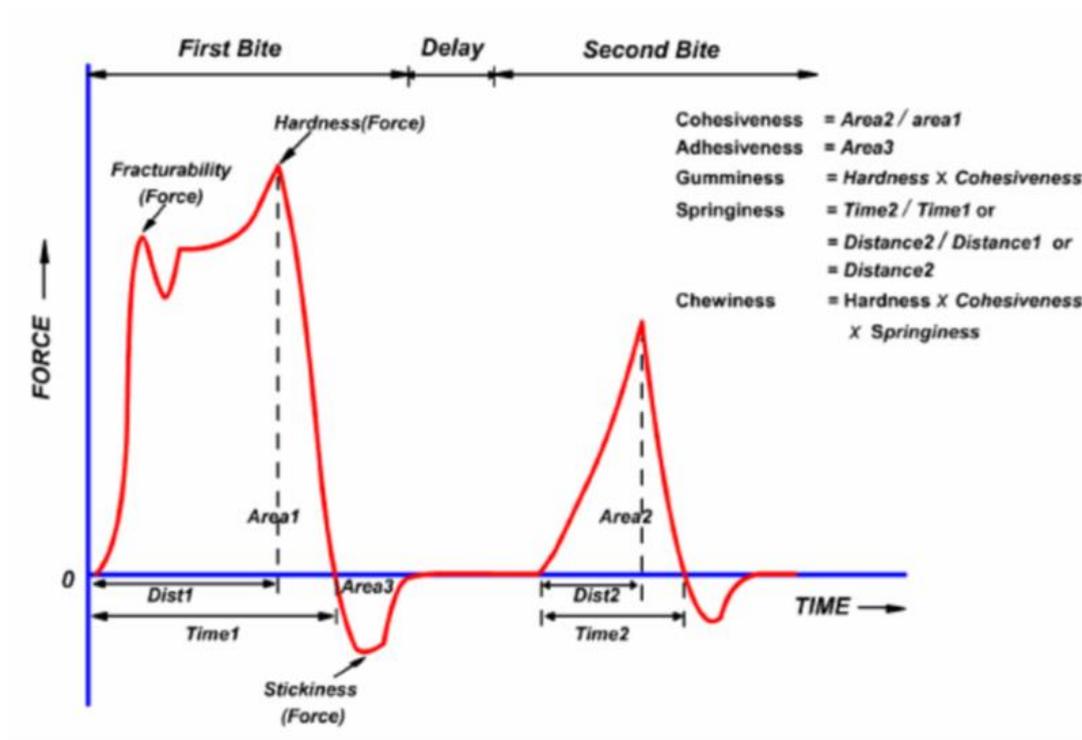


圖 3-12 全質構分析

Fig. 3-12 Texture profile analysis

(圖片來源 : Juliano, 1985)

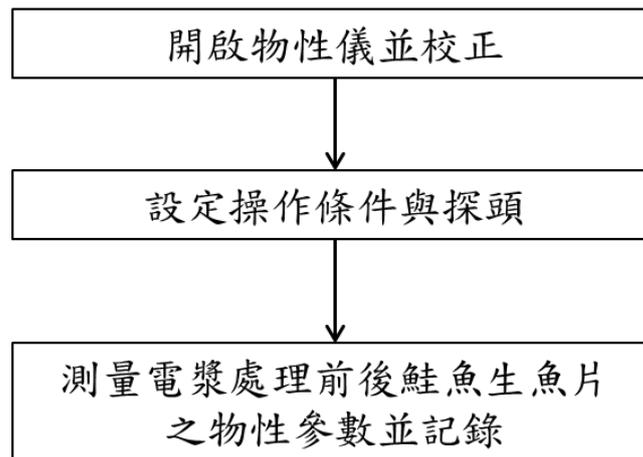


圖 3-13 質地分析之流程圖

Fig. 3-13 The procedures of texture analysis



第四章 結果與討論

本章節說明研究所獲得之結果並討論，包括 4.1 節電漿利用不同工作氣體對接種鮭魚生魚片諾羅病毒失活效果之影響與 4.2 節電漿處理後，鮭魚生魚片品質之影響，包含硫巴比妥酸價、pH 值、顏色測定及質地分析。

4.1 電漿利用不同工作氣體對諾羅病毒失活效果

本節探討不同工作氣體對諾羅病毒失活效果的影響，初始病毒量為 2.7×10^4 virus particles / g，電壓 180 V，電極間距 1 cm，氣體流速 15 L/min，處理接種於鮭魚生魚片之諾羅病毒，工作氣體分別為空氣、氧氣及氮氣。

當工作氣體為空氣時，電漿處理 9 分鐘後，未檢出，原因為 2.2.4 小節所述，當空氣經電漿變成離子化氣體後，產生自由基，而這些自由基中的活性氧與活性氮物質，使病毒失活，如圖 4-1 所示。

當工作氣體為氧氣時，電漿處理 9 分鐘後，病毒量減少至 3.1×10^3 virus particles / g，當電漿處理 12 分鐘，病毒則未檢出，因此多加探討 9、10、11 及 12 分鐘失活情形，如圖 4-2 所示。實驗結果原因為當工作氣體為氧氣時，氧氣在電漿中解離成各種粒子，而氧負離子(O⁻)與亞穩態氧分子(O₂^{*})碰撞生成臭氧，有文獻指出，臭氧處理 10 分鐘，諾羅病毒外的衣殼遭受破壞 (Predmore *et. al.* (b), 2015)；隨電漿生成

會產生活性氧物質(ROS)，活性氧物質可引起氧化反應，造成 RNA 的氧化損傷與結構變化(Yorimitsu and Klionsky, 2007；Chen *et. al.*, 2017)。

當工作氣體為氮氣時，電漿處理 12 分鐘後，病毒量減少至 5.3×10^3 virus particles / g，在統計上有顯著差異，但實際卻沒有效果，如圖 4-3 所示。本研究與 San-Cheong Bae 等人(2015)結果相似，當氮氣電漿處理 30 分鐘，從起初病毒量為 10^5 PFU/mL 下降至 10^3 PFU/mL，原因為氮分子甚安定，不易分解成為原子或離子，以及有文獻指出當工作氣體為氮氣時，幾乎檢測不出活性氮(龍，2006)，導致無法破壞病毒衣殼蛋白的結構與 RNA。

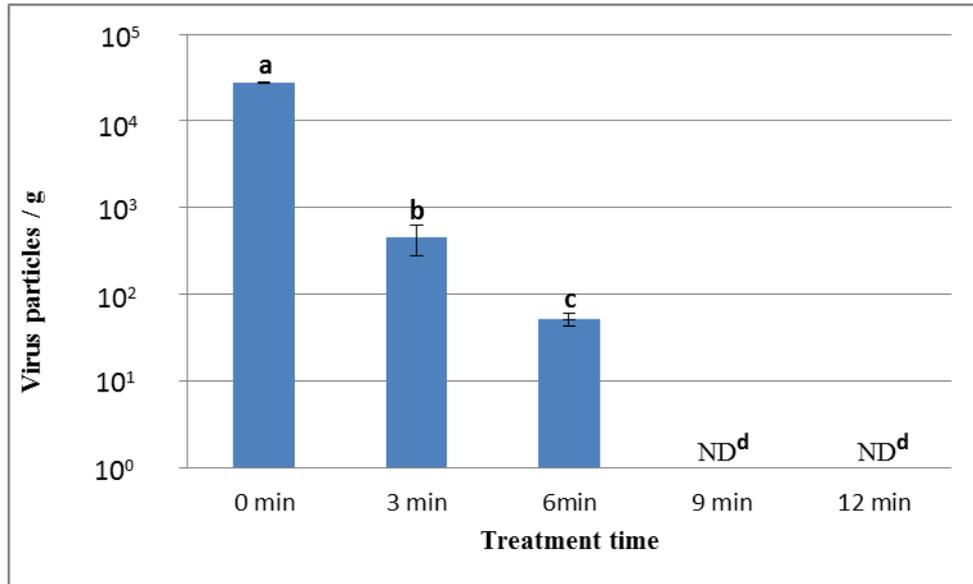


圖 4-1 空氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響

Fig.4-1 Norovirus inactivation by air plasma

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

^{a-d}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

ND = Not detected

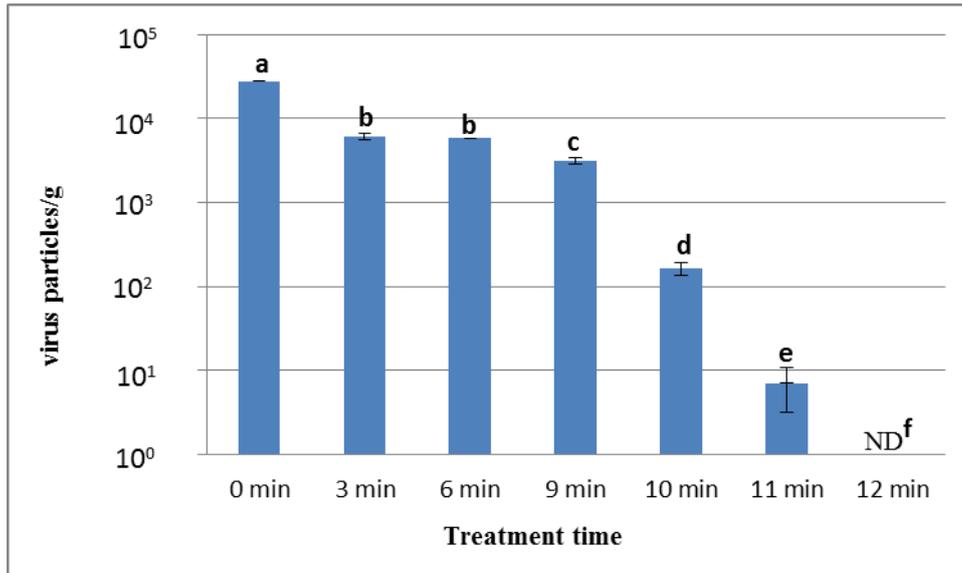


圖 4-2 氧氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響

Fig.4-2 Norovirus inactivation by oxygen plasma

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

^{a-f}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

ND = Not detected

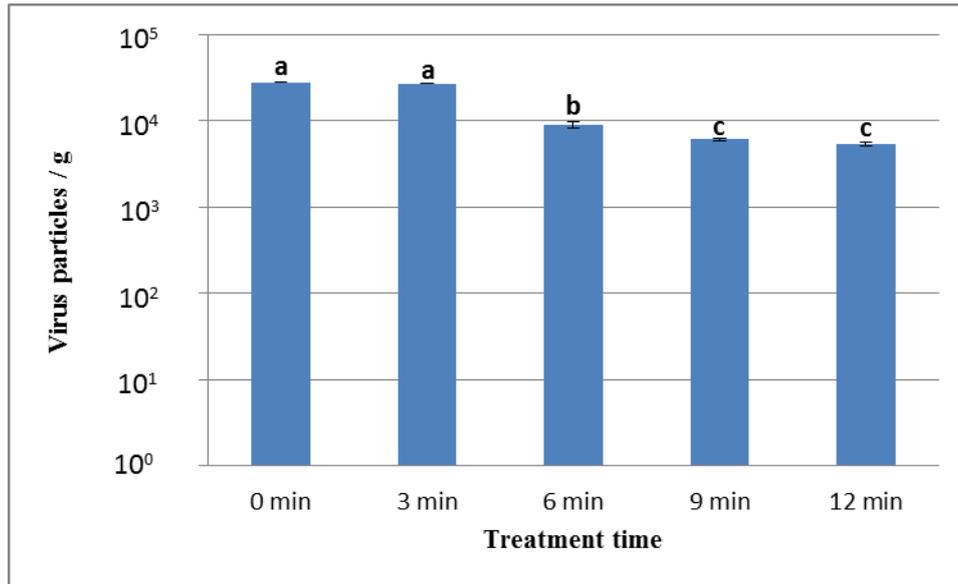


圖 4-3 氮氣電漿對諾羅病毒失活效果之影響

Fig.4-3 Norovirus inactivation by nitrogen plasma

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

^{a-c}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

4.2 電漿處理，對鮭魚生魚片品質之影響

由電漿失活諾羅病毒結果得知，工作氣體為空氣及氧氣有效果，因此品質評估以工作氣體為空氣處理 9 分鐘與氧氣處理 12 分鐘進行探討。

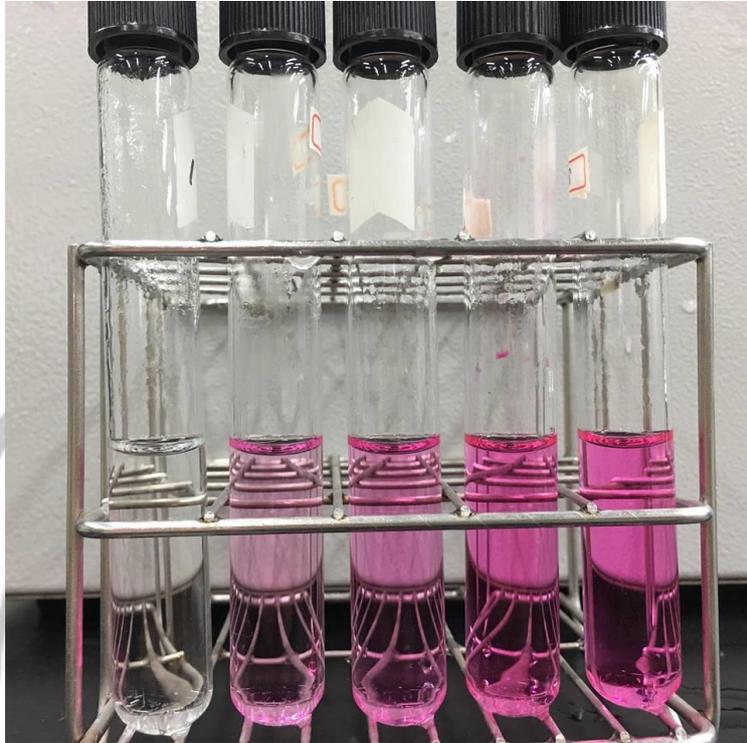
4.2.1 硫巴比妥酸價

本節討論不同工作氣體在不同時間對於鮭魚生魚片脂質氧化變化之影響。

圖 4-4 為不同濃度之丙二醛標準溶液與圖 4-5 為以相對之 TBARS 對 MDA 作圖呈現標準溶液之檢量線。

當工作氣體為空氣時，電漿處理 9 分鐘，鮭魚生魚片的 TBARS 值從 0.016 mg MDA /kg 上升至 0.220 mg MDA /kg；當工作氣體為氧氣時，電漿處理 12 分鐘，鮭魚生魚片的 TBARS 值從 0.016 mg MDA /kg 上升至 0.253 mg MDA /kg，如表 4-1 所示。

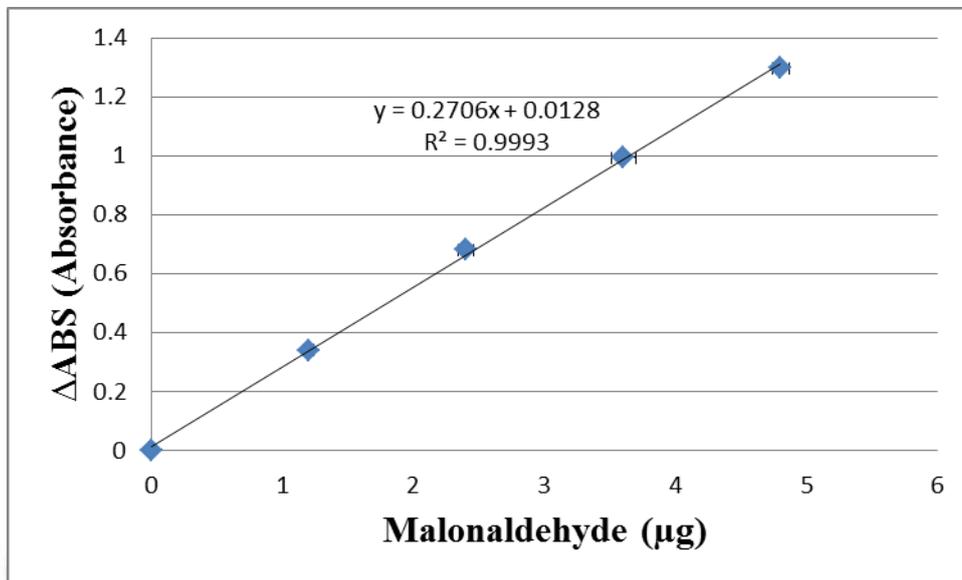
電漿處理後，不論空氣或氧氣，均對鮭魚生魚片的 TBARS 值造成顯著差異，因於電漿中產生的脂質過氧化物，如：自由基，造成脂質氧化 (Kim *et. al.*, 2013)，因此，脂質氧化副產物，如丙二醛 (Liu *et. al.*, 2008)，不過，有文獻指出 TBRAS 值必須大於 1.0 mg MDA /kg，人體感官才能偵測出鮮肉酸敗 (Mattison *et. al.*, 1986)，因此電漿處理，工作氣體不論空氣或氧氣，均不會造成對人體感官明顯負面的影響。



*由左至右為蒸餾水及不同濃度標準溶液(2mL、4mL、6mL、8mL)

圖 4-4 不同濃度之丙二醛標準溶液

Fig.4-4 Different concentrations of malondialdehyde



*吸光值 532nm

圖 4-5 標準溶液丙二醛含量之檢量線

Fig.4-5 The calibration curve of malondialdehyde

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

表4-1不同工作氣體對鮭魚生魚片之硫代巴比妥酸價測量(n=3)

Table. 4-1 2-Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) value measurement of salmon sashimi by different working gases (n=3)

Treatment time (min)	TBARS value (mg MDA /kg sample)	
	Air/APPJ	Oxygen/APPJ
0	0.016±0.000 ^a	0.016±0.000 ^a
3	0.072±0.001 ^b	0.080±0.002 ^b
6	0.124±0.001 ^c	0.157±0.008 ^c
9	0.220±0.000 ^d	0.213±0.006 ^d
12	n.m.	0.253±0.001 ^e

Values are mean ± standard deviation.

^{a-e}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

n.m.=Not measured

TBARS expressed as mg MDA (Malonaldehyde)/kg sample.

4.2.2 pH 值

本節討論不同工作氣體在不同時間對於鮭魚生魚片 pH 值之影響。

當工作氣體為空氣時，經電漿處理 9 分鐘，鮭魚生魚片的 pH 值從 6.35 下降至 6.29；當工作氣體為氧氣時，經電漿處理 12 分鐘，鮭魚生魚片的 pH 值從 6.32 下降至 6.02，如表 4-2 所示。

由結果可以得知，鮭魚生魚片透過空氣電漿或氧氣電漿處理，pH 值經統計過後，均顯著差異，原因為脂質氧化所造成，使 pH 值下降。有文獻指出，空氣電漿處理豬里脊肉的 pH 值比未處理的對照肉顯著低 (Soffels *et. al.*, 2008； Fröhling *et. al.*, 2012)。

雖然，經空氣電漿與氧氣處理，pH 值均下降，不過，下降的差異很小，且硫巴比妥酸價(TBARS)沒有影響，因此對 pH 值也幾乎沒有影響。

表4-2 不同工作氣體對鮭魚生魚片pH值之影響 (n=3)

Table. 4-2 pH of salmon sashimi by different working gases (n=3)

Treatment time (min)	pH	
	Air/APPJ	Oxygen/APPJ
0	6.35±0.01 ^a	6.32±0.01 ^a
3	6.37±0.01 ^{ab}	6.35±0.02 ^a
6	6.30±0.01 ^{ab}	6.11±0.01 ^b
9	6.29±0.01 ^b	6.16±0.02 ^{bc}
12	n.m.	6.02±0.03 ^c

Values are mean ± standard deviation.

^{a-c}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

n.m.=Not measured

4.2.3 顏色測定

本節討論不同工作氣體在不同時間對於鮭魚生魚片顏色測定之影響。

當工作氣體為空氣時，經電漿處理 9 分鐘後，鮭魚生魚片的 L 值從 50.50 下降至 49.20 與 a 值從 18.87 下降為 15.89，而 b 值從 26.44 上升至 27.01， $\Delta E = 3$ ，如表 4-3 所示。

當工作氣體為氧氣時，經電漿處理 12 分鐘後，鮭魚生魚片的 L 值從 50.65 下降至 47.54，a 值從 18.73 下降至 15.78，b 值從 26.75 上升至 29.47， $\Delta E = 5$ ，如表 4-4 所示。

結果顯示，電漿處理，工作氣體不論是空氣或氧氣，鮭魚生魚片經統計後，L 值、a 值與 b 值均有顯著差異，導致鮭魚生魚片亮度有稍微下降與略微偏黃。以上結果有文獻指出，原因為長時間暴露在空氣中，水分散失導致得 L 值下降，因此亮度下降以及電漿所產生的過氧化氫和肌紅蛋白之間的反應，而魚肉中含有色素蛋白質，如肌紅蛋白與血紅蛋白，肌紅蛋白與血紅蛋白含量越高，肉色越深，血合肉呈深紅色乃因肌紅蛋白與血紅蛋白含量高所致，如果暴露於空氣或不當儲存，肌紅蛋白與血紅蛋白將被氧化變成變性肌紅蛋白與褐變性血紅蛋白，導致魚肉變成黃褐色或暗褐色 (Brewer, 2004; Mancini and Hunt, 2005; 林等, 2009; Fröhling *et. al.*, 2012; 陳, 2013; Bae *et. al.*, 2015)。

當 ΔE 小於1.5時，兩者之間的色差通常是不明顯， ΔE 介於1.5-5時，色差需由經專業訓練人員的眼睛才能識別，而 ΔE 大於5時，顏色差異變得明顯，且大多數人看的出來 (Obón, 2009；Lao and Monica Giusti, 2017)。因此當工作氣體為空氣或氧氣時，對鮭魚生魚片的顏色無明顯的影響。



表4-3 空氣電漿處理鮭魚生魚片之顏色測定 (n=3)

Table. 4-3 Color of air plasma treated salmon sashimi (n=3)

Treatment time (min)	Color			ΔE
	L value	a value	b value	
0	50.50±0.00 ^a	18.88±0.04 ^a	26.44±0.06 ^a	0
3	49.04±0.47 ^b	16.86±0.18 ^b	26.47±0.27 ^b	2
6	49.46±0.01 ^b	15.94±0.03 ^c	26.45±0.01 ^b	3
9	49.20±0.10 ^b	15.89±0.02 ^c	27.01±0.03 ^b	3

Values are mean ± standard deviation.

^{a-c}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

表4-4 氧氣電漿處理鮭魚生魚片之顏色測定 (n=3)

Table. 4-4 Color of oxygen plasma treated salmon sashimi (n=3)

Treatment time (min)	Color		
	L value	a value	b value
0	50.65±0.33 ^a	18.73±0.27 ^a	26.75±0.19 ^a
3	49.72±0.55 ^a	16.56±0.08 ^b	27.47±0.51 ^b
6	49.42±0.48 ^a	16.43±0.38 ^b	27.53±0.01 ^b
9	49.30±0.55 ^{ab}	16.52±0.21 ^b	27.70±0.56 ^b
12	47.54±0.45 ^b	15.78±0.00 ^b	29.47±0.47 ^b

Values are mean ± standard deviation.

^{a-b}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

4.2.4 質地分析

本節討論不同工作氣體在不同時間對於鮭魚生魚片質地分析變化之影響。

當工作氣體為空氣時，經電漿處理 9 分鐘後，鮭魚生魚片的硬度從 14.2N 上升至 15.0N，彈性從 64.6% 下降至 63.9%；當工作氣體為氧氣時，經電漿處理 12 分鐘後，鮭魚生魚片的硬度從 14.2N 上升至 15.2N，彈性從 64.8% 下降至 62.9%，如表 4-5 與表 4-6 所示。

結果顯示，經電漿處理後，工作氣體不論空氣還是氧氣，鮭魚生魚片硬度均略微上升，而彈性有略微下降。原因為電漿噴出離子化氣體，風乾樣品表面，造成水分散失(Bae *et. al.*, 2015)，導致硬度上升，而彈性下降原因可能為脂質的氧化生成物對蛋白質作用，而使其變性，尤其是羰基化合物對蛋白質作用而造成損傷現象(吳等，1998)以及蛋白質氧化可以產生氨基酸殘基側鏈修飾和蛋白質多肽骨架的變化，導致蛋白質變性 (Shacter, 2000; Davies, 2005; Stadtman, 2006; Chen *et. al.*, 2013; Segat *et. al.*, 2014 ; Segat *et. al.*, 2015)。

表4-5 不同工作氣體對鮭魚生魚片硬度之影響 (n=3)

Table. 4-5 Hardness change of salmon sashimi by different working gases (n=3)

Treatment time (min)	Hardness (N)	
	Air/APPJ	Oxygen/APPJ
0	14.2±0.16 ^a	14.2±0.21 ^a
3	14.3±0.12 ^a	14.1±0.20 ^{ab}
6	15.0±0.08 ^b	15.0±0.21 ^{bc}
9	15.1±0.16 ^b	15.4±0.24 ^c
12	n.m.	15.2±0.21 ^c

Values are mean ± standard deviation.

^{a-c}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

n.m.=Not measured

表4-6 不同工作氣體對鮭魚生魚片彈性之影響 (n=3)

Table. 4-6 Springiness change of salmon sashimi by different working gases (n=3)

Treatment time (min)	Springiness (%)	
	Air/APPJ	Oxygen/APPJ
0	64.6±0.30 ^a	64.8±0.19 ^a
3	64.4±0.15 ^{ab}	64.3±0.20 ^b
6	64.1±0.10 ^{bc}	63.1±0.05 ^c
9	63.9±0.04 ^c	63.1±0.05 ^c
12	n.m.	62.9±0.16 ^c

Values are mean ± standard deviation.

^{a-c}Means in the same column are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

n.m.=Not measured

第五章 結論

當條件固定諾羅病毒初始量為 2.7×10^4 virus particles / g，電壓 180 V，電極間距 1 cm，氣體流速 15 L/min，本研究結果可分為常壓非熱噴射式電漿諾羅病毒失活效果與常壓非熱噴射式電漿對鮭魚生魚片品質評估進行結論：

1. 常壓非熱噴射式電漿諾羅病毒失活效果：

工作氣體為空氣時，處理 9 分鐘，諾羅病毒未檢出，氧氣則需處理 12 分鐘才能未檢出，而氮氣處理 12 分鐘，病毒量減少至 5.3×10^3 virus particles / g，因此可以歸納出，空氣失活諾羅病毒之效果最好，其次為氧氣，而氮氣沒有效果。

2. 常壓非熱噴射式電漿對鮭魚生魚片品質評估：

工作氣體為不論空氣或氧氣，TBARS 值，經統計均有顯著下降，但是，下降值並沒有達到人體感官可感受範圍 1.0 mg MDA /kg，因此不會造成影響。因為脂質氧化，造成鮭魚生魚片 pH 值下降，不過，硫巴比妥酸測試後，TBARS 值變化在人體感官範圍內，因此空氣或氧氣對鮭魚生魚片之 pH 值無明顯的影響。電漿處理，不論是空氣或氧氣，L 值與 a 值均下降，b 值則上升， $\Delta E \leq 5$ ，不過，鮭魚生魚片顏色變化在人體視覺感官可接受色差值範圍內，因此無明顯的影響。空氣電漿與氧氣電漿處理後，鮭魚生魚片硬度上

升而彈性下降，但變化量很小，因此無明顯的變化。

綜合以上結果得知，當諾羅病毒初始量為 2.7×10^4 virus particles /g，電壓 180 V，電極間距 1 cm，氣體流速 15 L/min，空氣失活病毒效果為最佳工作氣體，並且，對生魚片品質影響最小。

諾羅病毒爆發事件在世界各地逐年增加，但針對污染食品之諾羅病毒失活的方法卻很少，特別是生鮮及熱敏感食品，因此需開發一套特別對生鮮及熱敏感食品失活諾羅病毒的系統，後續研究可針對不同生食食品，如生鮮蔬果、飲用水等以及不同腸道型病毒進行研究，並代替現有技術，如：臭氧，擴大至可商業應用。

參考文獻

中文部分

王紹儒，噴射式大氣電漿電腦數值模擬研究—氬氣電漿參數之分析與探討，國立清華大學，工程與系統科學系 電漿物理組 碩士論文，2009。

左卷健男、柯麗文、高淑珍，圖解化學超有趣 初版，世貿出版社，第 106-107 頁，2003。

江村煌，輻射線的認識，初版，銀禾文化事業有限公司，第 52 頁，1992。

吳清熊、鴻巢張二、橋本周章，水產利用化學，世界學術譯著、國立編譯館出版，第 112 頁，1998。

李四海、井上信幸、芳野隆治，圖解 核融合能源，世茂出版有限公司，第 38 - 39 頁，2006。

李秀、賴滋漢、柯文慶，食品分析與檢驗，富林出版社，第 416 頁，2011。

李灝銘，以低溫電漿去除揮發性有機物之研究，國立中央大學 博士論文，2001。

林至榮，校園廢水及回收水中病毒族群及大小分析，私立東海大學，環境科學與工程研究所碩士論文，2016。

林美良，市售生魚片之衛生品質調查與安全之改進，國立中興大學，
食品科學系碩士論文，2002。

林淑瑗、顏裕鴻、王聯輝、蔡碧仁、鄔文盛、蕭泉源、林麗雲、陳時
欣，實用食品加工學(二版)，華格那企業有限公司，第七章 第
23-26 頁，2009。

邱思魁、丁任法，黃鰭鮪魚肉於低溫貯藏中鮮度與官能品質的變化，
台灣農業化學與食品科學，第 43 卷第 4 期，第 287-294 頁，2005。

邵廣昭、陳天任、賴景陽、何平合、柳芝蓮、陳章波，台灣常見魚介
貝類說(下) — 魚類，農業委員會輔導處 台灣省漁業局，第 49 - 50
頁，1996。

施敏、梅凱瑞(Gary S. May)、林鴻志，半導體製程概論，國立交通大
學出版，第 132 - 133 頁，2005。

洪建德，漁鄉美食沙西米的吃法，農委會漁業署漁業推廣，第 134 期，
1997。

徐詮亮、張宗良、謝松佑，常壓非熱電漿於食品科技之應用現況，食
品資訊，2014。

翁任賢，低溫熟成慙低溫水浴超音波嫩化海鱸生魚片之品質比較，國
立大學澎湖科技大學，食品科學系碩士論文，2011。

梁俊煌，運動訓練對人體體內自由基產生及抗氧化酵素之影響，嘉南學報，第三十二期，第 433-442 頁，2006。

陳中愷，常壓常溫電漿應用於乾酪殺菌與品質變化檢測，私立東海大學，食品科技組碩士論文，2013。

陳中愷、徐詮亮，電漿技術於食品殺菌之應用現況與展望，食品工業，第 8 期，45 卷，第 52-62 頁，2013。

陳柏廷，大氣電漿表面改質於聚乳酸人工血管支架對細胞培養之影響，國立交通大學，機械工程學系 碩士論文，2012。

陳盈方、彭盈方、陳信言、林學詩，小米品種加工適性分析之研究，臺東區農業改良場研究彙報，26：59-72，2016。

傅昭銘、工學博士、山崎耕造、沈文訓，圖解 電漿入門，世茂出版有限公司，第 14 - 15 頁，2007。

葉宗諺，利用 ROC 曲線評估色差量尺，大同大學 光電工程研究所 碩士學位論文，2014。

廖文進、吳錦楨、何善台、王志中，自由基與敗血症：超氧歧化酶的角色，中華民國重症醫學會，第 9 期，第 10-19 頁，2008。

劉明德、黃國石，圖解 病毒學，五南圖書出版公司，第 1-5 頁、第 24-27 頁，2016。

劉曜寬，介電質常壓電漿於塑膠包裝材料之殺菌應用，私立東海大學，

食品科技組碩士論文，2014。

鄭雅云，食品分析技術士技能檢定完全寶典(乙級)第二版，文野出版

社，第 59- 66 頁，2010。

鄭維智，從風險分析面向 談諾羅病毒防治新趨勢，ILSI Taiwan 專欄，

第 1-3 頁，2017。

黎孝韻、曾國慶，自由基及抗氧化物功能的探討，醫學雜誌，第 95

期，第 95-103 頁，2008。

龍文安，半導體奈米技術，五南圖書出版股份有限公司，

第 885-886 頁，2006。

蘇城祺，微波電漿火炬應用於分解半導體製程尾氣之初探，國立雲林

科技大學，環境與安全衛生碩士班 碩士論文，2009。

英文部分

- Ahn D.U., Kim I.S., Lee E.J.. Irradiation and additive combinations on the pathogen reduction and quality of poultry meat. *Poultry Science*. Vol. 92, 2013, pp. 534–545.
- Bae San-Cheong, Park Shin Young, Choe Wonho, Ha Sang-Do. Inactivation of murine norovirus-1 and hepatitis A virus on fresh meats by atmospheric pressure plasma jets. *Food Research International*. Vol. 76, Part 3, 2015, pp. 342–347.
- Bartosz G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol*. Vol. 43, 1996, pp. 645-659.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 87, 1990, pp. 1620-1624.
- Brewer S.. Irradiation effects on meat color – a review. *Meat Science*. Vol. 68, Issue 1, 2004, pp. 1–17.
- Chabot F., Mitchell J.A., Gutteridge J.M.C., Evans T.W.. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*. Vol. 11, 1998,, pp. 745-757.
- Chang Hung-chia, Wong Ren-xian. Textural and biochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) sashimi tenderised with the ultrasonic water bath. *Food Chemistry*. Vol. 132, Issue 3, 2012, p.p. 1340–1345.
- Chen N., Zhao M., Sun W., Ren J., Cui.. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate. *Food Research International*. Vol. 52, Issue 3, 2013, pp. 26 – 32.

- Chen Yong-Feng, Liu Hao, Luo Xin-Jing, Zhao Zhiqiang, Zou Zhen-You, Li Jing, Lin Xiao-Jing, Liang Yong. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Vol. 112, 2017, pp. 21–30.
- Davies M.J.. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1703, Issue 2, 2005, pp. 93 – 109.
- DiCaprio Erin. Recent advances in human norovirus detection and cultivation methods. *Current Opinion in Food Science*. Vol. 14, 2017, pp. 93–97.
- Feng K., Divers E., Ma Y., Li J.. Inactivation of a human norovirus surrogate, human norovirus virus-like particles, and vesicular stomatitis virus by gamma irradiation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77, 2011, pp. 3507–3517.
- Fernández K., Aspe E., Roeckel M.. Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control*. Vol. 20, Issue 11, 2009, pp. 1036–1042.
- Fröhling A., Durek J., Schnabel U., Ehlbeck J., Bolling J., Schlüter O.. Indirect plasma treatment of fresh pork: decontamination efficiency and effects on quality attributes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol. 16, 2012, pp. 381–390.
- Jean Julie, Morales-Rayas Rocío, Anoman Marie-Natacha, Safaa Lamhoujeb. Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiology*. Vol. 28, Issue 3, 2011, pp. 568–572.
- Juliano, B.O. Criteria and tests for rice grain qualities. In *Rice: Chemistry Technology*, edited by B.O. Juliano. The American Association of Cereal Chemistry, Inc., St. Paul, MN, U.S.A. 1985, pp. 443-524.

- Kang Sujin, Park Shin Young, Ha Sang-Do. Application of gamma irradiation for the reduction of norovirus in traditional Korean half-dried seafood products during storage. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 65, 2016, pp. 739–745.
- Kapikian Albert Z. , Richard G. Wyatt, Raphael Dolin, Thomas S. Thornhill, Anthony R. Kalica, Robert M. Chanock. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. *Journal of Virology*. Vol. 10, 1972, pp. 1075-1081.
- Kim Hyun-Joo, Yong HI, Park S., Choe W., Jo C.. Effects of dielectric barrier discharge plasma on pathogen inactivation and the physicochemical and sensory characteristics of pork loin. *Current Applied Physics*. Vol. 13, Issue 7, 2013, pp. 1420–1425.
- Kingsley D.H., Guan D.S., Hoover D.G.. Pressure inactivation of hepatitis A virus in strawberry puree and sliced green onions. *Journal of Food Protection*. Vol. 68, 2005, pp. 1748–1751.
- Lacombe Alison, Niemira Brendan A., Gurtler Joshua B., Sites Joseph, Boyd Glenn, Kingsley David H., Li Xinhui, Chen Haiqiang. Nonthermal inactivation of norovirus surrogates on blueberries using atmospheric cold plasma. *Food Microbiology*. Vol. 63, 2017, pp. 1–5.
- Lao Fei, Monica Giusti M.. The effect of pigment matrix, temperature and amount of carrier on the yield and final color properties of spray dried purple corn (*Zea mays* L.) cob anthocyanin powders. *Food Chemistry*. Vol. 227, 2017, pp. 376–382.
- Lee Yoonna, Kim Kangil, Kang Kyu-Tae, Lee Jong-Soo, Yang Sang Sik, Chung Woo-Hyun. Atmospheric-pressure plasma jet induces DNA double-strand breaks that require a Rad51-mediated homologous recombination for repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 560, 2014, pp. 1-9.

- Li Jianrong, Predmore Ashley, Divers Erin, Lou Fangfei. New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annual Review of Food Science and Technology*. Vol. 3, 2012 , pp 331-352.
- Liu H., Chen J., Yang L., Zhou Y.. Long-distance oxygen plasma sterilization: effects and mechanisms. *Applied Surface Science*. Vol. 254, Issue 6, 2008,pp. 1815–1821.
- Lou F.F., Neetoo H., Chen H.Q., Li J.R.. Inactivation of a human norovirus surrogate by high-pressure processing: effectiveness, mechanism, and potential application in the fresh produce industry. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77, 2011, pp. 1862–1871.
- Mancini R.A., Hunt M.C.. Current research in meat color. *Meat Science*. Vol. 71, Issue 1, 2005, pp. 100–121.
- María, C. A., C. Haro, S. N. González, and R. B. Medina. Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*. Vol. 5, 2013, pp. 801-809.
- Martinez Iciar, James David, Loréal Henri. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. *FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 455*, 2005.
- Mattison ML, Kraft AA, Olson DG, Walker HW, Rust RE, James D.. Effect of low dose irradiation of pork loins on the microflora, sensory characteristics and fat stability. *Journal of Food Science*. Vol. 51, 1986, pp. 284-287.
- Murchie L.W., Cruz-Romero M., Kerry J.P., Linton M., Patterson M.F., Smiddy M., Kelly A.L.. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol. 6, Issue 3, 2005, pp. 257–270.

- Obón J.M., Castellar M.R., Alacid M., J.A. Fernández-López. Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of Food Engineering*. Vol. 90, Issue 4, 2009, pp. 471–479.
- O'Connor N., Cahill O., Daniels S., Galvin S., Humphreys H.. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *Journal of Hospital Infection*. Vol. 88, Issue 2, 2014, pp. 59-65.
- Park Shin Young, Ha Sang-Do. Influence of NaCl on the inactivation of murine norovirus-1 and hepatitis A virus in the Korean traditional salted oyster product “Eoriguljeot” during storage. *Food Research International*. Vol. 62, 2014. pp. 382–387.
- Predmore Ashley, Sanglay Gabriel C., DiCaprio Erin, Li Jianrong, Uribec R.M., Lee Ken. Electron beam inactivation of Tulane virus on fresh produce, and mechanism of inactivation of human norovirus surrogates by electron beam irradiation. *International Journal of Food Microbiology*. Vol.198, 2015, pp. 28–36 (a).
- Predmore Ashley, Sanglay Gabe, Li Jianrong, Lee Ken. Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology*. Vol. 50, 2015, pp. 118–125 (b).
- Reuter S., Niemi K., Gathen V. Schulz-vonder, Döbele H.F.. Generation of atomic oxygen in the effluent of an atmospheric pressure plasma jet. *Plasma Sources Sci. Technol.*, Vol.18, Issue 1, 2009, pp. 1–9.
- Scherer Kathrin, Johne Reimar, Schrader Christina, Ellerbroek Lüppo, Schulenburg Jörg, Klein Günter. Comparison of two extraction methods for viruses in food and application in a norovirus gastroenteritis outbreak. *Journal of Virological Methods*. Vol. 169, Issue 1, 2010, pp. 22-27.

- Schütze A., Jeong JY, Babayan SE, Jaeyoung P., Selwyn GS, Hicks RF. The atmospheric-pressure plasma jet: a review and comparison to other plasma sources. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, Vol.26, Issue 6, 1998, pp. 1685–1694.
- Segat Annalisa, Misra N.N., Cullen P.J., Innocente Nadia. Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol. 29, 2015, pp. 247–254.
- Segat Annalisa, Misra N.N., Fabbro Astrid, Buchini Federica, Lippe Giovanna, Cullen Patrick J., Innocente Nadia. Effects of ozone processing on chemical, structural and functional properties of whey protein isolate. *Food Research International*. Vol. 66, 2014, pp. 356-372.
- Shacter E.. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, Vol.32, 2000, pp. 307 – 326.
- Soffels E., Sakiyama Y., Graves DB. *IEEE Trans. Plasma Sci.*, Vol.36, 2008, pp. 1441–1457.
- Stadtman E.R.. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, Vol. 40, Issue 12, 2006, pp. 1250 – 1258.
- Venkataram Prasad B.V., Shanker S., Muhaxhiri Z., Choi J.-M., Atmar R.L., Estes M.K.. Chapter 3.1 – Structural Biology of Noroviruses. *Viral Gastroenteritis Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. 2016, pp.329-354.
- Wang Dapeng, Tian Peng. Inactivation conditions for human norovirus measured by an in situ capture-qRT-PCR method. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 172, 2014, pp. 76–82.

- Wang Guomin, Zhu Ruihao, Yang Licong, Wang Kaile, Zhang Qian, Su Xia, Yang Bing, Zhang Jue, Fang Jing. Non-thermal plasma for inactivated-vaccine preparation. *Vaccine*. Vol. 34, Issue 8, 2016, pp. 1126–1132.
- Whittaker AG, Graham EM, Baxter RL, Jones AC, Richardson PR, Meek G., Campbell GA, Aitken A., Baxter HC. Plasma cleaning of dental instruments. *Journal of Hospital Infection*. Vol. 56, Issue 1, 2004, pp. 37–41.
- Woedtke Th. von, Reuter S., Masur K., Weltmann K.-D.. Plasmas for medicine. *Physics Reports*. Vol. 530, Issue 4, 2013, pp. 291–320.
- Wu Yuwei, Chang Sam, Nannapaneni Ramakrishna, Coker Randy, Haque Zee, Mahmoud Barakat S.M.. The efficacy of X-ray doses on murine norovirus-1 (MNV-1) in pure culture, half-shell oyster, salmon sushi, and tuna salad . *Food Control*. Vol. 64, 2016, pp. 77-80.
- Yorimitsu Tomohiro and Klionsk Daniel J.. Eating the endoplasmic reticulum:quality control by autophagy. *Trends Cell Biol.*, Vol. 17, 2007, pp. 279–285.
- Zimmermann J L, Dumler K, Shimizu T, Morfill G E, Wolf A, Boxhammer V, Schlegel J, Gansbacher B, Anton M. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *Journal of physics D: Applied Physics*. Vol. 44, 2011, pp. 9.

網路部分

Center for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.A., Clinical Overview, 2013.

<https://www.cdc.gov/norovirus/hcp/clinical-overview.html>

Center for Disease Control and Prevention (CDC), U.S.A., Laboratory Diagnosis & Treatment, 2012.

<https://www.cdc.gov/norovirus/hcp/diagnosis-treatment.html>

General Accounting Office (GAO), Food irradiation, 2000.

<http://www.gao.gov/new.items/rc00217.pdf>

衛生福利部食品藥物管制署，食品微生物之檢驗方法-諾羅病毒之檢驗，2013。

<http://www.fda.gov.tw/TC/siteListContent.aspx?sid=103&id=9350>

衛生福利部食品藥物管制署，諾羅病毒 (Norovirus)，2010。

<http://www.fda.gov.tw/TC/siteContent.aspx?sid=1947>