

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組碩士論文  
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：李根永 博士

Advisor : Ken-Yuon Li, Ph.D.

脈衝電場對食品中毒病原菌殺菌之致死效率及其在諾麗果汁  
殺菌之應用

Effect of PEF on foodborn pathogen inactivation and noni juice disinfection



研究生：張展維 撰  
Graduate Student : Chan-Wei Chang

中華民國九十九年七月

July , 2010

# 目錄

摘要.....	I
Abstract .....	III
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、脈衝電場簡介.....	2
(一) 脈衝電場(pulsed electric fields; PEF)背景.....	2
(二) 脈衝電場作用原理.....	3
(三) 脈衝電場的應用.....	8
1. PEF 應用於流體食品殺菌.....	8
2. 脈衝電場殺菌之影響因子.....	13
(1) 電場強度( Electric field intensity ).....	13
(2) 處理時間.....	16
(3) 樣品溫度.....	16
(4) 脈衝波形.....	17
(5) 食品組成成分.....	18
3. PEF 應用於食品加工.....	20
(1) 改善蔬果的壓榨和萃取.....	20
(2) 軟化蔬果組織.....	20
(3) 外在壓力增加代謝物.....	21

(4) 肉類預處理 .....	21
(5) 廢水處理 .....	22
二、PEF 應用於諾麗果汁的處理 .....	26
(一) 諾麗果汁的特性 .....	26
(二) 諾麗果汁發酵及其微生物變化 .....	28
參、實驗材料與方法 .....	30
一、實驗材料 .....	30
(一) 試驗菌株 .....	30
(二) 諾麗果原料 .....	30
(三) 藥品及培養基 .....	30
(四) 儀器設備 .....	32
二、實驗方法 .....	38
(一) 實驗大綱 .....	38
(二) 實驗架構 .....	39
(三) 培養基之製備 .....	40
(四) 測試 PEF 的殺菌效率 .....	40
1.病原菌活化及菌液製備 .....	40
2.PEF 處理 .....	41
(1) 探討不同脈衝寬度、電場強度對病原菌的殺菌效果 .....	41

(2) 探討不同微生物的臨界電場強度.....	42
(3) 比較不同微生物致死所需能量.....	42
(4) 探討比能量公式之適用性.....	43
(四) 諾麗果於不同溫度、時間發酵之微生物變化.....	44
1. 原料前處理.....	44
2. 不同時間下控溫發酵.....	45
3. 傳統培養菌相分析.....	45
(1) 總生菌數、總真菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之分析.....	45
(2) 分離單一菌落.....	46
4. 以 PCR 分析、鑑定菌相.....	46
(1) 微生物 genomic DNA 萃取.....	46
(2) PCR 條件建立.....	46
(3) PCR-16S rDNA 片段瓊脂膠體電泳檢視.....	47
肆、結果與討論.....	50
一、PEF 對食品中毒病原菌的殺菌效果.....	50
(一) 不同脈衝寬度對殺菌效果之影響.....	50
(二) 殺菌效果的臨界電場強度.....	56
(三) PEF 比能量與殺菌力之關係.....	62
(四) 探討比能量公式的適用性以及預測 PEF 殺菌效果的準確性.....	68

二、PEF 應用於諾麗果汁殺菌的探討.....	74
(一) 諾麗果於控溫發酵下微生物生長情形.....	74
(二) 發酵期間微生物菌種之鑑定.....	79
三、PEF 對醋酸菌的殺菌效果.....	95
伍、結論.....	104
陸、參考文獻.....	106
柒、附錄.....	119

## 圖次

圖一、以圖示細胞膜由可恢復至無法恢復的崩解過程 .....	錯誤! 尚未定義書籤。
圖二、橢圓形細胞中 $f(A)$ 、 $A_F$ 的定義 .....	5
圖三、胞膜上電穿孔導致細胞死亡的過程 .....	7
圖四、在內部電場與外加電場同方向下，不同橢圓形微生物形態對其臨界電場的影響 .....	15
圖五、圖示 PEF 輸入 40 kJ/Kg 比能量處理起始溫度為 55°C 樣品過程能量回收再利用 .....	19
圖六、以 PEF(2 kV/cm)對兩種品種蘋果渣做預處理，比較在不同能量下與酵素處理後果汁的產量變化 .....	23
圖七、搭配不同油脂萃取技術，比較未處理及施以 PEF 對玉蜀黍胚芽作前處理(3 kV/cm; 15 kJ/kg)後油脂產率變化 .....	24
圖八、施以(1.2 kV/cm, 10 kJ/kg)之 PEF 處理後，對馬鈴薯組織的影響 .....	25
圖九、寬脈波脈衝電場產生器架構圖 .....	33
圖十、寬脈波脈衝電場產生器硬體架設級配置圖 .....	34
圖十一、寬脈波脈衝電場產生器波形圖譜 .....	35
圖十二、樣品槽外觀 .....	36
圖十三、熟成的諾麗果外觀 .....	44
圖十四、不同電場強度(kV/cm)處理下脈衝寬度對大腸桿菌的影響 .....	53

圖十五、不同電場強度(kV/cm)處理下脈衝寬度對對金黃葡萄球菌的影響.....	54
圖十六、不同電場強度(kV/cm)處理下脈衝寬度對仙人掌桿菌的影響.....	55
圖十七、 <i>E. coli</i> 、 <i>S. aureus</i> 、 <i>B. cereus</i> 經不同比能量之 PEF 處理對殺菌效率之影響.....	61
圖十八、 <i>E. coli</i> 、 <i>S. aureus</i> 、 <i>B. cereus</i> 在固定 6 $\mu$ s 脈衝寬度下，不同比能量 PEF 處理之效果.....	67
圖十九、PEF 處理的大腸桿菌殘存率預測值與實測值之相關性.....	70
圖二十、PEF 處理的金黃葡萄球菌殘存率預測值與實測值之相關性.....	71
圖二十一、PEF 處理的仙人掌桿菌殘存率預測值與實測值之相關性.....	72
圖二十二、諾麗果於 25°C 下，不同發酵期間總真菌數、總生菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之變化情形.....	76
圖二十三、諾麗果於 35°C 下，不同發酵期間總真菌數、總生菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之變化情形.....	77
圖二十四、諾麗果新鮮果汁及於 25°C 發酵 1 週之果汁，分別塗抹於 PCA (A)和 PDA (B)中之微生物菌相.....	81
圖二十五、諾麗果於 25°C 發酵 2、3、4 週之果汁，分別塗抹於 PDA (A)、PCA (B)和 PCA (C)中之微生物菌相.....	82
圖二十六、諾麗果於 35°C 發酵 1、2、3 週之果汁，皆塗抹於 PCA 中，分別是(A)、(B)、(C)之微生物菌相.....	83

圖二十七、廠商發酵之諾麗果汁塗抹在 MRS 上之微生物菌相.....	84
圖二十八、由諾麗果分離之微生物 DNA 的 PCR-16S rDNA 反應結果.....	85
圖二十九、由諾麗果分離之醋酸菌屬演化樹狀圖.....	88
圖三十、由諾麗果分離之桿菌菌屬演化樹狀圖.....	89
圖三十一、由諾麗果分離之微球菌菌屬演化樹狀圖.....	91
圖三十二、由諾麗果分離之球菌菌屬演化樹狀圖.....	92
圖三十四、比電場強度在 $6\mu\text{s}$ 脈衝寬度的 PEF 殺菌處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌之影響.....	95
圖三十五、比電場強度在 $9\mu\text{s}$ 脈衝寬度的 PEF 殺菌處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌之影響.....	96
圖三十六、比能量對 PEF 處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌、及仙人掌桿菌殺菌效果之影響.....	99
圖三十七、PEF 處理的醋酸菌屬殘存率預測值與實測值之相關性.....	102



## 表次

表一、運用高壓脈衝電場殺菌之文獻.....	11
表二、脈衝電場對酵素影響之文獻.....	12
表三、PCR 過程條件設定.....	47
表四、脈衝寬度對大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌臨界電場強度之影響..	59
表五、病原菌的特性概要.....	60
表六、不同脈衝寬度( $\mu s$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對大腸桿菌殺菌效果及處理後溫度之影響.....	64
表七、不同脈衝寬度( $\mu s$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對金黃葡萄球菌殺菌效果及處理後溫度之影響.....	65
表八、不同脈衝寬度( $\mu s$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對仙人掌桿菌殺菌效果及處理後溫度之影響.....	66
表九、固定脈衝寬度 $6 \mu s$ 的 PEF 處理大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌菌數殘存率預測值和實際值之比較.....	69
表十、諾麗果汁發酵過程中的菌株.....	78
表十一、脈衝寬度為 6 與 $9 \mu s$ 時, PEF 處理醋酸菌致死所需臨界電場強度.....	97
表十二、不同脈衝寬度( $\mu s$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對醋酸菌屬殺菌效果及處理後溫度之影響.....	100
表十三、固定脈衝寬度 $6 \mu s$ 的 PEF 處理醋酸菌屬菌數殘存率預測值和實際值之	



## 符號表

$A$	length of semi-axis of ellipsoid ( $\mu\text{m}$ )
$A_F$	length of semi-axis of in field direction ( $\mu\text{m}$ )
$b_E$	electric field rate constant (cm/kV)
$E$	external electric field strength (kV/cm)
$Ec$	critical electric field strength (kV/cm)
$f$	frequency (Hz)
$f(A)$	shapq factor
$I$	electric current (A)
$V$	electric voltage (V)
$S$	survival ratio
$t$	operation time (seconds)
$Tt$	treatment time ( $\mu\text{s}$ )
$T$	temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
$W_{specific}$	specific energy input (J/g)

### Greek letters

$\Delta\phi_M$	critical transmembrane potential (1 V)
$\tau$	pulse width ( $\mu\text{s}$ )
$\rho$	density of microorganisms

## 摘要

脈衝電場(Pulsed electric fields; PEFs)可應用於流體食品的非加熱殺菌，具有操作快速及耗能低等優點。影響 PEF 殺菌效果的參數主要有電場強度、處理時間及操作溫度，其中處理時間是脈衝波數與脈衝寬度之乘積。本研究測試 PEF 於不同殺菌參數條件下對大腸桿菌(*Escherichia coli*)、金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)的殺菌效果。結果得知金黃葡萄球菌在  $9\ \mu\text{s}$  脈衝寬度， $12.5\ \text{kV/cm}$  電場強度時，可降低  $3.79\ \log_{10}$  值；大腸桿菌在  $12\ \mu\text{s}$  脈衝寬度  $10.5\ \text{kV/cm}$  電場強度時，可降低  $3.72\ \log_{10}$  值；仙人掌桿菌在  $12\ \mu\text{s}$  脈衝寬度， $9.75\ \text{kV/cm}$  電場強度時，可降低  $4.48\ \log_{10}$  值，且其 PEF 作用時間分別是金黃葡萄球菌為 0.027 秒；大腸桿菌、仙人掌桿菌為 0.036 秒。此三株菌臨界致死所需的比能量分別測定為 770、590 和 577 J/g。此外以脈衝寬度  $6\ \mu\text{s}$  在不同電場強度的 PEF 條件下測試大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌及醋酸菌之殺菌效果，並由測試數據求得線性回歸方程式。此回歸方程式經驗證後，可正確的估算 PEF 在不同條件參數下的殺菌效果。將這套 PEF 殺菌方法應用於諾麗(*Morinda citrifolia* L.)果汁的殺菌。發酵製作的諾麗果汁中，確認得知醋酸菌(*Acetobacter orientalis*)為優勢菌。此醋酸菌株施以脈衝寬度  $9\ \mu\text{s}$ ，電場強度  $13.13\ \text{kV/cm}$ ，作用時間 0.027 秒的 PEF，菌數可降低  $1.37\ \log_{10}$  值。醋酸菌是 GRAS 的菌株，不需完全滅菌，以 PEF 處理可降低菌數，確保品質，並可減少對熱敏感的機能性成份受到破壞。

## Abstract

Pulsed electric field (PEF) is a non-thermal process for inactivating foodborne microbes. The process can be applied on liquid foods with merits, such as easy operation, and low energy consumption. Electric field, treatment time, and temperature are major operation parameters, in the of PEF process. In this study, effect of PEF operation parameters on inactivating *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* has been detected. The survival ratio of *S. aureus* was reduced to 3.79 log<sub>10</sub> values, when the operation parameters were fixed at 9μs pulse width and 12.5 kV/cm electric field and 0.027 sec. treatment time; the survival ratio of *E.coli* was reduced to 3.72 log<sub>10</sub> values, when the operation parameters were at 12μs pulse width and 10.5 kV/cm electric field and 0.036 sec. treatment time; the survival ratio of *B.cereus* was reduced to 4.48 log<sub>10</sub> values, when the operation parameters were at 12μs pulse width and 9.75 kV/cm electric field and 0.036 sec. treatment time. The critical specific energy values of these three bacterial strains were determined as 770, 590 and 577 J/g, respectively. In addition, four regression models of electric field effect on the survival ratio of *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, and *A. orientalis* derived from experimental data under the condition of pulse width fixed on 6μs. These regression models were available to predict microbial inactivation effect of PEF treatment at various electric fields. The methodology of PEF was applied on inactivating microbes in noni ( *Morinda citrifolia* L.) juice. A strain of *A. orientalis* isolated from fermented noni juice was adopted as an index. The survival ratio of this bacterium was reduced 1.37 log<sub>10</sub> value, as the PEF treatment performed at 9μs pulse width and 13.13 kV/cm and 0.027 sec. treatment time. The dominant microbial strain of the fermented noni juice was *A. orientalis*,

hence the fermented juice might not need to be sterilized. The non-thermal PEF treatment is believed preserving more biofunctional compounds of the juice.

## 壹、前言

脈衝電場(pulsed electric fields; PEF)殺菌是一種能兼顧食品營養、口感、風味的殺菌技術，具有低溫、操作快速、耗能低等優點，是傳統加熱殺菌的替代方法。脈衝電場殺菌的原理是破壞微生物的細胞膜結構及胞膜上的蛋白質通道，影響細胞活性導致死亡。目前此一技術已應用於流體食品的殺菌，如脫脂牛奶、水果果汁、葡萄酒等食品。脈衝電場亦可用於加工的前處理，經此程序可提高果汁、植物油、胞內物質的產量，或縮短食品乾燥及肉品醃漬時間；此外利用植物或微生物菌體生產保健食品，脈衝電場的處理則可增加酚類物質、二級代謝物等生物活性物質的釋出而提升產量。

目前國內對此項殺菌技術的研究正在起步階段，脈衝電場儀器設備尚未普及價格昂貴，可預期未來應用於高價位產品會有較佳的實用效益。諾麗果汁是一種高價位的保健食品，具有抗氧化、抗癌、抗過敏、降血壓、止痛等功效。諾麗果汁以自然發酵製作，經二至三個月發酵後，汁液需經殺菌才可飲用，傳統的加熱殺菌會破壞維生素、抗氧化物及一些機能性的成份，因此脈衝電場應用於諾麗果汁的殺菌處理，具有發展的利基。

脈衝電場處理設備昂貴，是商業應用的瓶頸。長庚大學電機系自行設計裝配了一套高壓脈衝電場產生器，本研究利用此套設備，測試對病原菌的殺菌效率，探討不同參數對殺菌效率的影響，並將取得的初步的操作數據應用於諾麗果汁優勢菌的殺菌處理，以作為未來開發商業化技術的基礎。

## 貳、文獻回顧

### 一、脈衝電場簡介

#### (一) 脈衝電場(pulsed electric fields; PEF)背景

早在 19 世紀末就有科學家研究，利用電流殺死牛奶中的微生物(Prochownick and Spaeth, 1890 ; Thiele and Wolf, 1899)，以 300 mA 直流電加熱牛奶，殺死牛奶中的金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。到了 1920 年代，科學家則開始研究利用電壓(220 V)取代電流應用於食品殺菌，這個過程稱” Electropure process ” (Beattie and Lewis, 1925 ; Fetterman, 1928 ; Moses, 1938)，是利用食品中的電阻產熱殺死微生物，之後以溫度為主的殺菌方法演變成超高溫殺菌法(Ultra high temperature ; UHT)才中止相關研究(Toepfl *et al.*, 2007)。

以高電壓破壞微生物則是到了 1950 年後才從歐姆加熱殺菌法中獨立出來，有科學家將食品置於兩電極片中，並施以 32 kV 的電壓，此過程稱為”Electrohydraulic”，通電後在電極片間會產生電弧(arcs)，形成一短暫脈衝壓、紫外光以及產生一些電化學反應導致微生物死亡(Gilliland and Speck, 1967)。因為”Electrohydraulic”有一定殺菌效果且操作快速、價格低廉，因此取代以高溫或添加化學藥劑作為廢水處理(Allen and Soike, 1967)，在同年亦開始有系統的研究脈衝電場對微生物的殺菌機制(Sale and Hamilton, 1967)，並且隔年提出在脈衝電場殺菌過程中，電場強度是最重要的影響因子。爾後經過陸陸續續的研究，在美國有科學家開發使用高電場強度處理乳製品、果汁、全蛋液等液態食品，除了可有效延長保

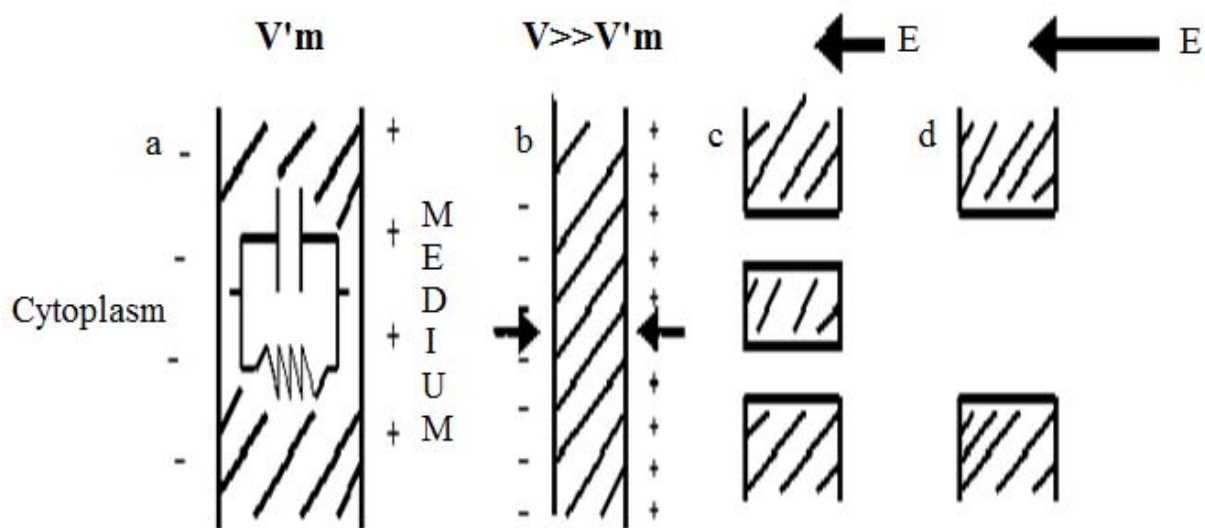


存期限，在操作過程的溫度亦不會高於 45°C，且殺菌效果等同於巴氏得低溫殺菌法(Anonymous, 1987)。到了 1990 年後才將此項技術商業化，並應用於食品加工、殺菌(Jeyamkondan *et al.*, 1999)。在 1995 年由 Pure Pulse Technologies 公司設計一款連續式脈衝電場殺菌裝置，同年此項技術也獲得美國食品藥物管理(USFDA)認可，並在隔年即應用到全蛋液的殺菌(Barbosa-Canovas and Altunakar, 2007)。脈衝電場除了應用於食品加工、殺菌，在分子生物科技上也有採用，如 DNA transformation (Miller *et al.*, 1988)。

## (二) 脈衝電場作用原理

PEF 作用的原理是將食品置於兩電極片間，在短時間內 (< 1 sec.) 施以高強度電場(5~70 kV/cm)，造成食品中微生物死亡或其所產生的酵素失活，其殺菌機制有兩種假設：(1)電崩解( electrical breakdown)和(2)電穿孔( electroporation)。

(1) 電崩解: 微生物之細胞膜猶如一電容器，在細胞內外充滿電解質，平時細胞膜內外電壓差為 10 mV，隨著胞外電場增加，而胞膜的厚度則隨之降低，當內外電壓差超過 Critical transmembrane potential ( $\Delta\phi_M$ ，而  $\Delta\phi_M$  約為 1 V)，則會使胞膜產生孔洞(transmembrane pores)而放電，並導致細胞膜分解。細胞膜具流動性，而小孔洞是可恢復的，若孔洞大且持續時間長，則雙層膜結構會瓦解，造成不可逆的破壞，導致微生物死亡，如圖一。



圖一、以圖示細胞膜由可恢復至無法恢復的崩解過程。(a)細胞膜臨界電壓  $V'_m$ ; (b)細胞膜被壓縮; (c)胞膜開始崩解形成可恢復的孔洞; (d)胞膜上形成大量大面積不可恢復孔洞。

Fig 1. Schematic diagram of reversible and irreversible breakdown. (a) cell membrane with potential  $V'_m$ , (b) membrane compression, (c) pore formation with reversible breakdown, (d) large area of the membrane subjected to irreversible breakdown with large pores.

(Zimmermann, 1986)

而形成  $\Delta\psi_M$  的公式如下:

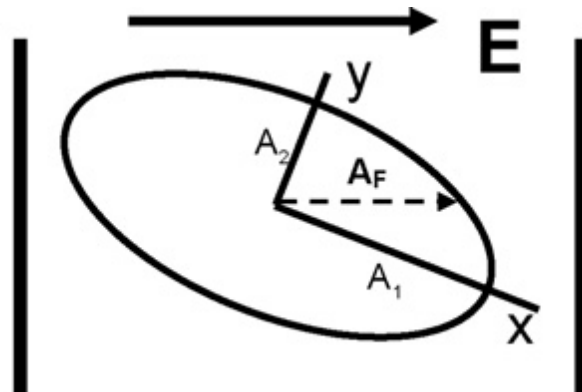
$$\Delta\psi_M = -f(A)A_F E \quad (2-1)$$

其中  $\Delta\psi_M$  (Critical transmembrane potential);  $f(A)$  是細胞的形狀因子(Shape factor)，如球狀、橢圓狀和長桿狀;  $A_F$  ( $\mu m$ ) 是與外加電場同一方向，由細胞中心到細胞膜間距;  $E$  (kV/cm) 是外加電場強度(Zimmermann *et al*, 1974)。

$f(A)$  的計算方式如下:

$$f(A) = \frac{2}{2 - A_1 A_2 A_3 \int_0^{\infty} \frac{1}{(s + s_F^2) \left( \sum_{n=1}^3 \sqrt{s + A_n^2} \right)}} \quad (2-2)$$

上述方程式中的  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  是以細胞中心為基準到細胞膜的距離，即該細胞的長、寬、高，以圖二為例。



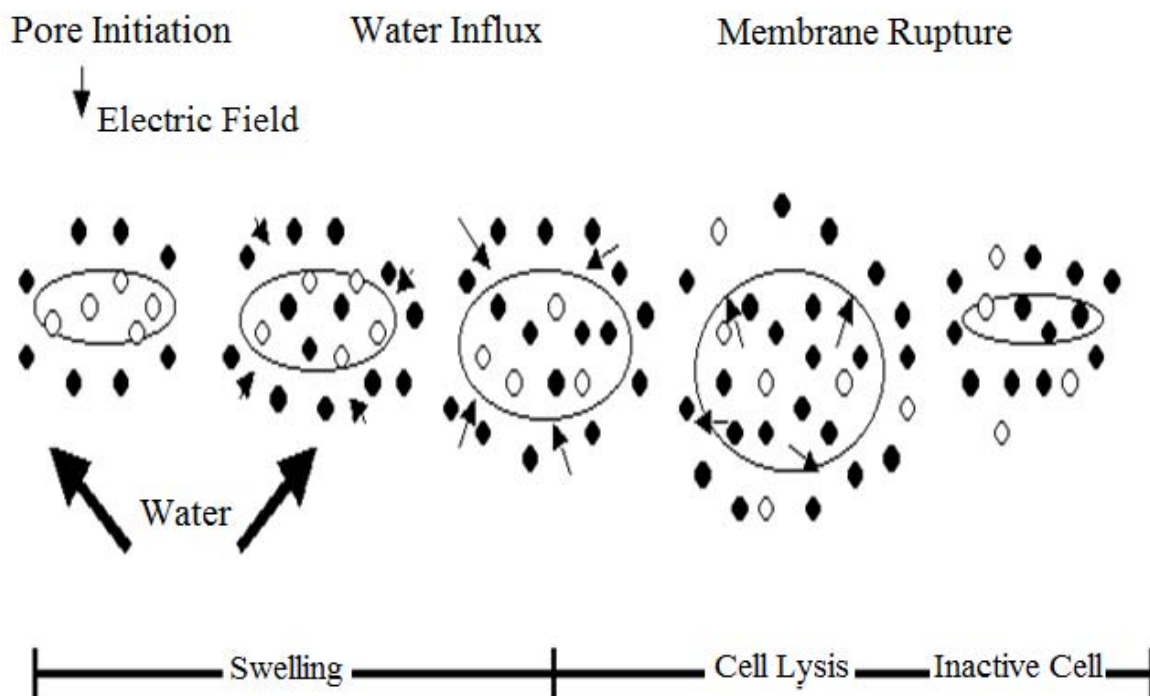
(Toepfl *et al*, 2007)

圖二、橢圓形細胞中  $f(A)$ 、 $A_F$  的定義。

Fig. 2 The definition of  $f(A)$  and  $A_F$  for ellipsoidal cell.

因此，不同微生物的臨界電場也會有所不同，以大腸桿菌為例，其細胞壁約 5 nm， $\Delta\psi_M$  為 1 V，則臨界電場強度(Critical electric fields strength)  $E_c$  為 2000 kV/cm (Zimmermann *et al*, 1996)。

(2) 電穿孔: 當細胞施以一外加電場，胞膜及其上的蛋白質會呈現暫時性不穩定現象，此種現象稱為電穿孔(Electroporation) (Castro *et al*, 1993)，起初胞膜對小分子呈可穿透性，隨外加電場強度提升，胞膜上的疏水性孔洞會轉變成親水性孔洞，使胞外溶液滲入量亦會提高，讓細胞持續膨脹，最終導致細胞膜破裂。外加電場作用是增加孔洞面積、數量以及改變蛋白質通道結構，而導致胞膜穿透性(Permeability)增大，如圖三，亦有文獻利用 propidium iodine 螢光法，在模式實驗中證實微生物胞內物質的滲出(Unal *et al*, 2002)。除此之外，提高脈衝波持續時間、降低溶液導電度皆可有相同效果。



圖三、胞膜上電穿孔導致細胞死亡的過程。

Fig 3. The died processing of electroporation on a cell membrane for the cell.

(Vega-Mercado *et al.* 1996)

### (三) 脈衝電場的應用

#### 1. PEF 應用於流體食品殺菌

在 PEF 殺菌過程中，Electrical breakdown 是使胞膜形成大量孔洞，而 Electro-poration 則是影響胞膜上的蛋白質使胞膜滲透性提高，以達到殺死微生物或使微生物產生的酵素失活，主要應用於液態食物殺菌，如牛奶、果汁、全蛋液、綠茶、葡萄酒，詳見表一、表二。此項殺菌技術屬於低溫殺菌法，相較於傳統熱殺菌法，PEF 在相同殺菌效果過程中仍可確保食品的風味、色澤和營養成分不受影響，除了能延長食品保存期限，亦可使食品損害降到最低(Yeom *et al.*, 2000 ; Bendicho *et al.*, 2002 ; Hodgins *et al.*, 2002 ; Elez-Martínez *et al.*, 2005 ; Odriozola-Serrano *et al.*, 2006)。

以番茄、西瓜汁為例，這兩種果汁中富含番茄紅素、類胡蘿蔔素、維他命 C，這幾種化學物質除了可以提供紅色色素外，還具有抗氧化、抗發炎甚至可以預防癌症和心血管疾病等功效。但這幾種成分易在傳統熱殺菌(pasteurization)過程中被破壞，導致殺菌後的果汁失去對人體有益的機能性成分(Stahl & Sies, 1996 ; Nicoli *et al.*, 1999 ; Rao & Agarwal, 1999 ; Braddock, 1999 ; Arab & Steck, 2000 ; Davey *et al.*, 2000 ; Dumas *et al.*, 2003)。有文獻指出在甜瓜果汁(Melon juice)以 OSU-4F 型號 PEF 儀器處理( $E$ : 35 kV/cm;  $T_t$ : 1250 $\mu$ s;  $\tau$ : 4 $\mu$ s)，當脈衝波數為 175、250 Hz 時，對 *E. coli*、*Sal. enteritidis* 的殺菌效果分別降低菌數 3.91、3.75  $\log_{10}$  值，且處理後溫度皆未超過 40°C (Jonathan *et al.*, 2007)，見表一；亦有其他文獻採用相同型號儀器，對番茄汁、西瓜汁施以相近的 PEF 處理參數。電場皆是 35

kV/cm，其餘參數( $Tt$ 、 $\tau$ 、 $f$ )前者為 1250 $\mu$ s、4 $\mu$ s、100 Hz，後者為 2050 $\mu$ s、7 $\mu$ s、250 Hz，處理後溫度皆未超過 40°C。結果顯示番茄、西瓜汁中的 lycopene 含量比未處理者要高，分別提高 7.6 %、13%;而用 90°C 處理 30 秒者，lycopene 含量亦提高 4.67%，但在 4°C 冷藏儲存時 lycopene 會自氧化而失去其生理功效，在第一週，以 PEF 處理後，相較於熱加工者(90°C; 30 秒)，可維持較多 lycopene (0.8 ~ 1.7%)，到了第 8 週時，PEF 處理者則比熱加工者高 26.7 ~ 29.5%;而對 Vit. C 則皆會下降，經 PEF 處理後前者剩 86.5%，後者剩 72%，而以熱加工 (90°C; 30 秒)處理則剩 80.4%;在總多酚量含量上，不論是 PEF 或是熱加工，在處理前後皆未有顯著變化 (Isabel *et al.*, 2008 ; Gemma *et al.*, 2009)。此外，以 PEF 處理葡萄酒、綠茶(E: 31、38.4 kV/cm)，菌數可分別降低 3、4.9  $\log_{10}$  值，且對其色澤並無顯著影響(Puértolas *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2008)，見表一。

傳統熱殺菌亦會受限不同食品熱物理性質(thermophysical)的不同，使得熱量傳遞效率不一致，在達到殺死微生物的目的時，會使食品產生一溫度梯度，除了使操作時間延長亦容易破壞食品中對熱敏感物質，使食品品質降低;相反的 PEF 在達到相同致死條件下卻可以省下熱量傳導這段時間，因此具有操作快速、耗能低(約是傳統熱殺菌的 1/1000)等優點(Heinz *et al.*, 2003; Phusique & Industrie)。但 PEF 殺菌亦有些缺點，所應用的產品必須是低導電度(mS/cm)且樣品處理槽裡不能有氣泡殘留(Wouters *et al.*, 2001)。

此外，也有文獻指出因為食品成分過於複雜或是 PEF 處理後期已死亡微生物

影響 PEF 殺菌效果，使得 PEF 殺菌效果不如預期(Martin-Belloso *et al.*, 1997 ; Zhong *et al.*, 2005)。根據美國食品藥物管理局(USFDA)規定，應用於液態食品的殺菌技術，必須有降低 5  $\log_{10}$  值的殺菌效果才能應用市售產品的殺菌(USFDA, 2002)。因此，科學家為了能提高 PEF 的殺菌效果，便添加一些有機酸、酵素、細菌素和香料等天然抑菌物質，(Mittal & Griffiths, 2001 ; Smith *et al.*, 2002 ; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006)，例如 PEF(90 kV/cm ; 30 pulses ; 45°C)配合使用 nisin 和 lyzsome 對橘子果汁中沙門氏菌的殺菌效果可下降 4.28  $\log_{10}$  值(Liang *et al.*, 2002)。



表一、運用高壓脈衝電場殺菌之文獻。

Table1. Examples of recent data on the inactivation of microorganism in food products by PEF.

Microorganism	Fluid Food	E (kV/cm)	n <sup>a</sup>	$\tau^b$ ( $\mu$ s)	$T_t^c$ ( $\mu$ s)	f (Hz)	T ( $^{\circ}$ C)	Log <sub>10</sub> reduction	Reference
<i>L. innocua</i>	Whole milk	29	312	0.8	250	100	36	2.0	Picart <i>et al.</i> , 2002
<i>L. innocua</i>	Dairy cream	37.5	250	1.0	250	100	36	2.0	Picart <i>et al.</i> , 2002
<i>L. innocua</i>	media	20	6	6.2	112	50	35	6.0	Toepfl <i>et al.</i> , 2007
<i>L. monocytogenes</i>	Skim milk	20	10	3.25	32.5	–	35	1.0	Fleischman <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli O157:H7</i>	Apple cider	90	10	2.0	20	–	42	5.91	Iu <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i>	Liquid egg	32.9	180	0.17	30	–	20	4.7	Malicki <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i>	Melon juice	35	38	4.0	1250	250	39	3.91	Jonathan <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli O157:H7</i>	Liquid egg	11	40	2.0	80	1	60	4.0	Bazhal <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus cereus</i>	Skim milk	31	20	–	6.0	–	25	0.7	Sobrino <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus cereus</i>	Apple juice	25	8.3	2.0	100	–	30	1.3	Cserhalmi <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus megaterium</i>	media	20	6	6.2	112	50	35	6.0	Toepfl <i>et al.</i> , 2007
<i>S. aureus</i>	Skim milk	35	124	3.7	459	250	40	3.7	Evrendilek <i>et al.</i> , 2004
<i>S. aureus</i>	Green tea	38.4	–	2	200	667	25	4.9	Zhao <i>et al.</i> , 2008
<i>S. aureus</i>	Skim milk	35	600	4.0	2400	100	25	1.0	Sobrino-López <i>et al.</i> , 2006
<i>S. aureus</i>	Apple juice	40	100	1	667	15	57	5.4	Walkling-Ribeiro <i>et al.</i> , 2008
<i>Sal. Typhimurium</i>	Orange juice	90	50	2.0	100	–	55	5.9	Liang <i>et al.</i> , 2002
<i>Sal. Enteritidis</i>	Melon juice	35	38	4.0	1250	175	39	3.75	Jonathan <i>et al.</i> , 2007
<i>Sacch. bayanus</i>	Wine	31	100	–	–	1	30	3	Puertolas <i>et al.</i> , 2009

a: number of pulses. ; b: pulse width. ; c: treatment time ( $\mu$ s). ; – :No reported.

表二、脈衝電場對酵素影響之文獻。

Table 2. Literature review on the effects of pulsed electric fields on enzymes.

Enzyme	Operating conditions	Medium	Pulse characteristics	T (°C)	Inact.(%)
Plasmin (bovine milk)	Continuous (45 ml/min.)	SMUF	E = 30 kV/cm, w = 2 $\mu$ s	15	90
	Electrodes: parallel, V= 8 cm <sup>3</sup> , d = 0.6 cm	100 $\mu$ g plasmin/ml	Np = 50, f = 0.1 Hz		
Protease ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> M3/6)	Continuous (0.5 l/min.)	Skim milk	E = 15 kV/cm, w = 2 $\mu$ s	50	60
	Electric: coaxial, V= 28.5 cm <sup>3</sup> , d = 0.6 cm		Np = 98, f = 2 Hz		
Alkaline phosphatase (bovine milk)	Batch	Raw milk	E = 15 kV/cm, w = 400 $\mu$ s	22	60
	Electrodes: d = 0.6 cm		Np = 70		
Lactoperoxidase (milk)	Batch	Raw milk	Exp. Decay	NR	0
	Electrodes: V= 25 cm <sup>3</sup> , d = 0.5 cm		E = 21.5 kV/cm		
Lipase (wheat germ)	Batch	Deionized water	Exp. Decay	20	85
	Electrodes: V= 49.5 cm <sup>3</sup> , d = 0.3 cm		E = 87 kV/cm, w = 2 $\mu$ s Np = 30, f = 0.5 Hz		
Glucose-oxidase ( <i>Aspergillus niger</i> )	Batch	Buffer (pH 5.1)	Exp. Decay	20	75
	Electrodes: V= 49.5 cm <sup>3</sup> , d = 0.3 cm	+50 mM Na- acetate	E = 87 kV/cm, w = 2 $\mu$ s Np = 30, f = 0.5 Hz		
$\alpha$ -Amylase ( <i>Bacillus licheniformis</i> )	Batch	Deionized water	Exp. Decay	20	85
	Electrodes: V= 49.5 cm <sup>3</sup> , d = 0.3 cm		E = 80 kV/cm, w = 2 $\mu$ s Np = 30, f = 0.5 Hz		
Peroxidase (soybean)	Batch	Buffer (pH 6.0)	Exp. Decay	20	27
	Electrodes: V= 49.5 cm <sup>3</sup> , d = 0.3 cm	+100 mM K- phosphate	E = 87 kV/cm w = 2 $\mu$ s Np = 30, f = 0.5 Hz		

(Van Loey *et al.*, 2002)

## 2. 脈衝電場殺菌之影響因子

影響 PEF 殺菌效果的參數有很多，如電場強度( $E$ ; kV/cm)、處理時間( $Tt$ ;  $\mu$ s)、脈衝頻率( $f$ ; Hz)、脈衝寬度( $\tau$ ;  $\mu$ s)、樣品溫度( $T$ ;  $^{\circ}$ C)、電極間距( $d$ ; cm)、波形、處理模式(Static/Continue step)、導電度( $C$ ; S/cm)、流速(ml/min.)、微生物的形狀、大小和細胞壁結構，甚至連食品組成成分亦會影響 PEF 殺菌效果。其中以電場強度、處理時間為最主要的影響參數，兩者可換算成殺菌所需比能量(Specific energy;  $W_{specific}$ ) (J/g)，而溫度、脈衝波形和微生物大小及細胞壁結構次之(Castro *et al*,1993; Stapulionis *et al.*,1999; Loske *et al*,2002; Ravishankar *et al*,2002)。

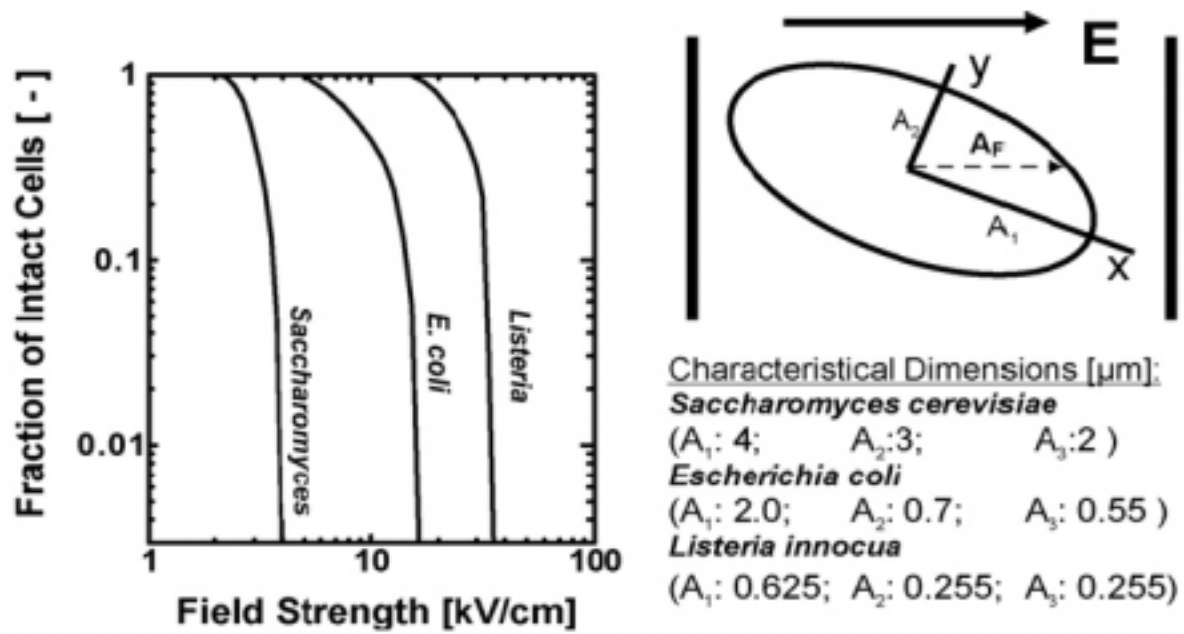
### (1) 電場強度( Electric field intensity )

電場強度是殺菌的主要因素之一，當電場強度所誘導之膜內外跨膜電壓高於膜內外電位差  $\Delta\phi_M$  時，殺菌效果會隨電場強度之增加而增大，而此電場強度為菌體致死所需臨界電場強度(Critical electric fields strength;  $E_c$ )( Qin *et al.*, 1998 )

。這結果與 electroporation 理論相符合，即微生物胞膜內外兩邊的誘導電動勢之差異與外加電場成正比，且  $E_c$  也會因為微生物細胞大小、細胞壁結構以及脈衝寬度(Pulse width)不同而有所變化。

若待處理的微生物形態愈小或是屬於格蘭氏陽性菌者，則  $E_c$  較大，如圖四所示，體積較大之微生物，其  $E_c$  較小。而格蘭氏陽性菌的細胞壁較厚(約 15~80 nm) 對物理性質破壞較有抵抗力;格蘭氏陰性菌則是相反，雖然細胞壁有三層，但厚度

只有 10~15 nm，因此對 PEF 抵抗力較低 (Castro *et al.*, 1993 ; Mazurek *et al.*, 1997 ; Jeyamkondan *et al.*, 1999 ; Dutruieux *et al.*, 2000 ; Toepfl *et al.*, 2007)。根據文獻，孢子對 PEF 的抵抗力最高，是因為孢子結構是由內膜 (inner membrane)、孢子壁 (spore wall) 組成雙層膜，外圍再累積胛肽聚糖行層含有內殼 (inner coat)、外殼 (outer coat) 及孢子外壁 (exosporium) 的皮層 (cortex)，結構緊密所以可以抵抗高溫、乾燥和化學性滲透等外力所致 (Marquez *et al.*, 1997)。Schoenbach 等人 (1997) 發現處理孢子的  $E_c$  值於 Pulse width  $> 50 \mu\text{s}$ ， $E_c$  為 4.9 kV / cm，Pulse width  $< 2 \mu\text{s}$  則  $E_c$  為 40 kV / cm。



圖四、在內部電場與外加電場同方向下，不同橢圓形微生物形態對其臨界電場的影響。

Fig. 4 Impact of orientation of ellipsoidal microorganisms relative to the electrical field  $E$ . At a cell specific threshold level the field strength inside the cell membrane exceeds a threshold level  $E_{\text{crit}}$ . (Toepfl *et al*, 2007)

## (2) 處理時間( Treatment Time )

PEF 處理時間( $Tt$ )計算方式為： $Tt = \tau \times f \times t$  ( Sale and HamiHon , 1967 )，其中  $\tau$ ( $\mu$ s)是單位脈衝下的寬度， $f$ (Hz)是施打的脈衝頻率， $t$ (sec.)是實驗操作時間。當電場強度大於  $E_c$  時， $E_c$  隨著脈衝寬度增加而降低，使 PEF 殺菌效果提高;而脈衝波數對 PEF 殺菌的影響較脈衝寬度低，在某些情況下( 例如 *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* )，增加脈衝波數其殺菌效果會呈現飽和狀態 ( Barbosa-Canovas *et al.*, 1999 ; Jonathan *et al.*, 2008 )，但上述文獻中的脈衝頻率都很低，約 100 ~ 250 Hz，但是亦有文獻指出，脈衝頻率提高時 (>1000 Hz)，可提升 PEF 的殺菌效果(Zhong *et al.*, 2005)。提高脈衝寬度會導致食品溫度增高，將其控制在不破壞食物中熱敏感物質之下，可有效提升 PEF 殺菌效果。且應用於連續式模式之 PEF 處理時，可視 PEF 處理體積多寡來搭配冷卻裝置降溫，避免處理過程溫度上升太高而影響食品的营养及風味。

## (3) 樣品溫度

PEF 殺菌過程會隨輸入的比能量( $W_{Specific}$ )加大而使溶液溫度上升，但因殺菌過程的作用時間短(< 1 秒)，再加上連續式的 PEF 處理模式會使熱量更容易散失，因此 PEF 處理過程中樣品上升的溫度對整體殺菌效果影響有限，但產生的熱能卻會造成額外能量的浪費。於是科學家將待處理的樣品先加熱到一定溫度，可視其所含對熱敏感物質的極限而調整，結果發現只需較低的輸入能量亦可達到相同的殺菌效果，以大腸桿菌(*Escherichia coli*)為例，起始樣品起始溫度為 35°C，

要降低  $3 \log_{10}$  值的殺菌效果需 60 KJ/kg 的能量;而當起始溫度為  $65^{\circ}\text{C}$  時，只要 5 KJ/kg 的能量即可有相同殺菌效果(Heinz *et al.*, 2003 ; Toepfl *et al.*, 2007 )，因此有科學家就採用先預熱到一定溫度，再施以 PEF 處理，之後通過冷卻槽降溫，可視食品殺菌情況重複此步驟循環，以達最好殺菌效果(Jaeger *et al.*, 2008)。亦有科學家將樣品經 PEF 處理後產生的熱能回收回來加熱未處理的樣品，這樣可以省去最初預熱樣品及最終冷卻樣品所需能量，可提升能量的利用效率，見圖五。

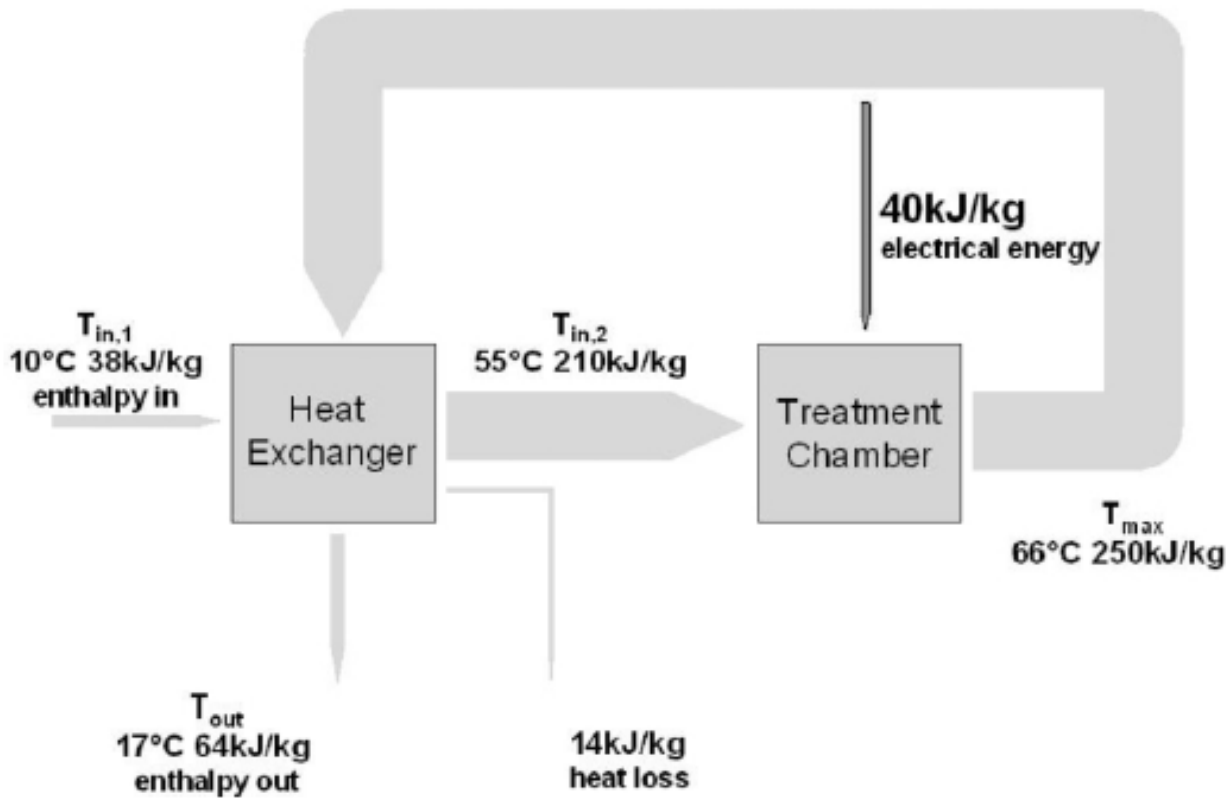
#### (4) 脈衝波形

脈衝波形有 exponential decaying、square wave 和 oscillatory bipolar (or instant charge reversal pulse)三種。其中 oscillatory pulse 殺菌效果最低，而 square wave pulse 比 exponential decaying pulse 的效果要好，但也最耗能。而產生 square wave pulse、exponential decaying pulse 波形的設備與電路皆不同，前者是用許多開關組並連，後者則是串連，因此前者可產生較大的能量(De Haan *et al.*, 2002)，且在固定電壓( $V$ )及處理時間( $Tt$ )下，exponential decaying pulse 會浪費較多的能量(McDonald *et al.*, 2000 ; Picart *et al.*, 2002)。電擊過程中採用 bipolar 比 monopolar 效果要好，因為 bipolar 波會導致膜內極性分子的陳列方向隨波形的極性而變動，因此導致胞膜的緊迫而更易破裂( Ho *et al.*, 1995 ; Qin *et al.*, 1994 )，bipolar 更有效應用能量及降低食品固形物在電場上的黏著。Instant charge reversal pulse 與 bipolar 之差別在於前者脈衝之後並無 relaxation time，Instant charge reversal pulse 比其他脈衝節省  $1/5 \sim 1/6$  之能源及設備費用( Ho *et al.*, 1997 )。

## (5) 食品組成成分

食品中所含的脂質、蛋白質會吸收PEF處理過程中產生的自由基，保護微生物不受其攻擊而崩解，因此食品中組成成分愈混雜，PEF對其殺菌效率愈差，可由表一中的文獻觀察到，乳製品殺菌效果最差，果汁類則比較好(Martin-Belloso *et al.*, 1997)。食品中的導電度亦會影響PEF殺菌效果，導電度愈大者，也就是食品中離子強度越大，會產生較小的電場強度，因此殺菌效果較差(Hülshager *et al.*, 1981; Vega-Mercado *et al.*, 1996)。pH值越小，造成胞內H<sup>+</sup>的增加，因而破壞DNA或ATP等，使得微生物失活率增大(Vega-Mercado *et al.*, 1996)。一般而言，在對數期(logarithmic phase)的微生物處於分裂狀態，對於外力比較敏感，因而殺菌效果較好。溶液之含菌量、食品抑菌槽的結構等也與殺菌效果有關(Hülshager *et al.*, 1983)。高壓脈衝電場對粉狀物料的殺菌效果不顯著(Keith *et al.*, 1997)。





圖五、圖示PEF輸入40 kJ/Kg比能量處理起始溫度為55°C 樣品過程能量回收再利用。註:該樣品比熱為3.8 kJ /kg\* K，且在熱交換過程熱損失不超過5%。

Fig. 5 Enthalpy diagram of a energy recovery that suggested PEF treatment system for liquid sample with an initial temperature of 55°C and a specific energy input of 40 kJ/kg. As specific heat capacity 3.8 kJ /kg\* K was used, the heat loss in the heat exchanger was estimated for 5%.

(Jaeger *et al.*, 2008)

註:一開始樣品由10°C預熱至55°C，經PEF處理後，透過熱交換器由處理後樣品提供未預熱之樣品溫度上升所需能量，在熱能轉換過程，散失的能量約14 kJ/kg。

## 2. PEF應用於食品加工

PEF作用原理是破壞胞膜結構以提高胞膜通透性，此技術若施以較低電場強度，則可作為食品加工的預處理步驟，提高果汁產量、縮短製程時間以及降低製程中所浪費之能源。低電場強度的PEF可改善下列加工製程：

### (1) 改善蔬果的壓榨和萃取

在傳統上果汁、油脂壓榨和萃取的方法無非是利用研磨、壓力、高溫以及酵素和強酸破壞細胞膜，使胞膜內的成分被擠壓至胞外，但是這些方法容易造成食品組織的破壞以及一些營養成分的流失。因此在一些製程中可用低電場強度PEF取代，以提高果汁產率，見圖六，同時對果汁中的pH值、糖度、酸度皆不會有影響(E:0.1~0.52 kV/cm) (Bazhal and Vorobiew, 2000 ; Fincan *et al.*, 2004 ; Lebovka *et al.*, 2004 ; Toepfl *et al.*, 2005);用PEF作前處理可提高油脂產量，見圖七。經PEF作用所得之油脂，在儲存過程中，油脂中的不飽和脂肪酸特性、皂化價並無顯著變化，但自由脂肪酸、葉綠素含量則有顯著提高(Guderjan *et al.*, 2007);亦可從殘存的果渣中再回收一些胞內的抗氧化物、色素及機能性成份(Eshtiaghi and Knorr, 2000 ; Fincan *et al.*, 2004 ; Balasa *et al.*, 2006 )。

### (2) 軟化蔬果組織

利用低電場強度的PEF處理植物組織，使植物胞膜呈半滲透性且降低細胞的膨壓，使得植物組織軟化，見圖八，而軟化後的組織可降低油炸時油脂的攝入量(Fincan and Dejmek, 2003 ; Janositz *et al.*, 2005);葡萄果汁、果渣皆施以三種電場強

度之PEF處理(0.5、1、2.4 kV/cm)，可使多酚化合物含量增加，相較於未處理果汁，其多酚化合物含量分別提高13%、22%和28%；而果渣部分則提高4%、15%、14% (Balasa and Knorr, 2006)；對植物組織施以0.22~1.6 kV/cm之電場強度做前處理後，可有效縮短乾燥時所需時間，以節省能量，若配合冷凍乾燥技術，可有效保留食品中對熱敏感物質的含量(Rastogi *et al.*, 1999; Ade-Omowaye *et al.*, 2001)。

### (3) 外在壓力增加代謝物

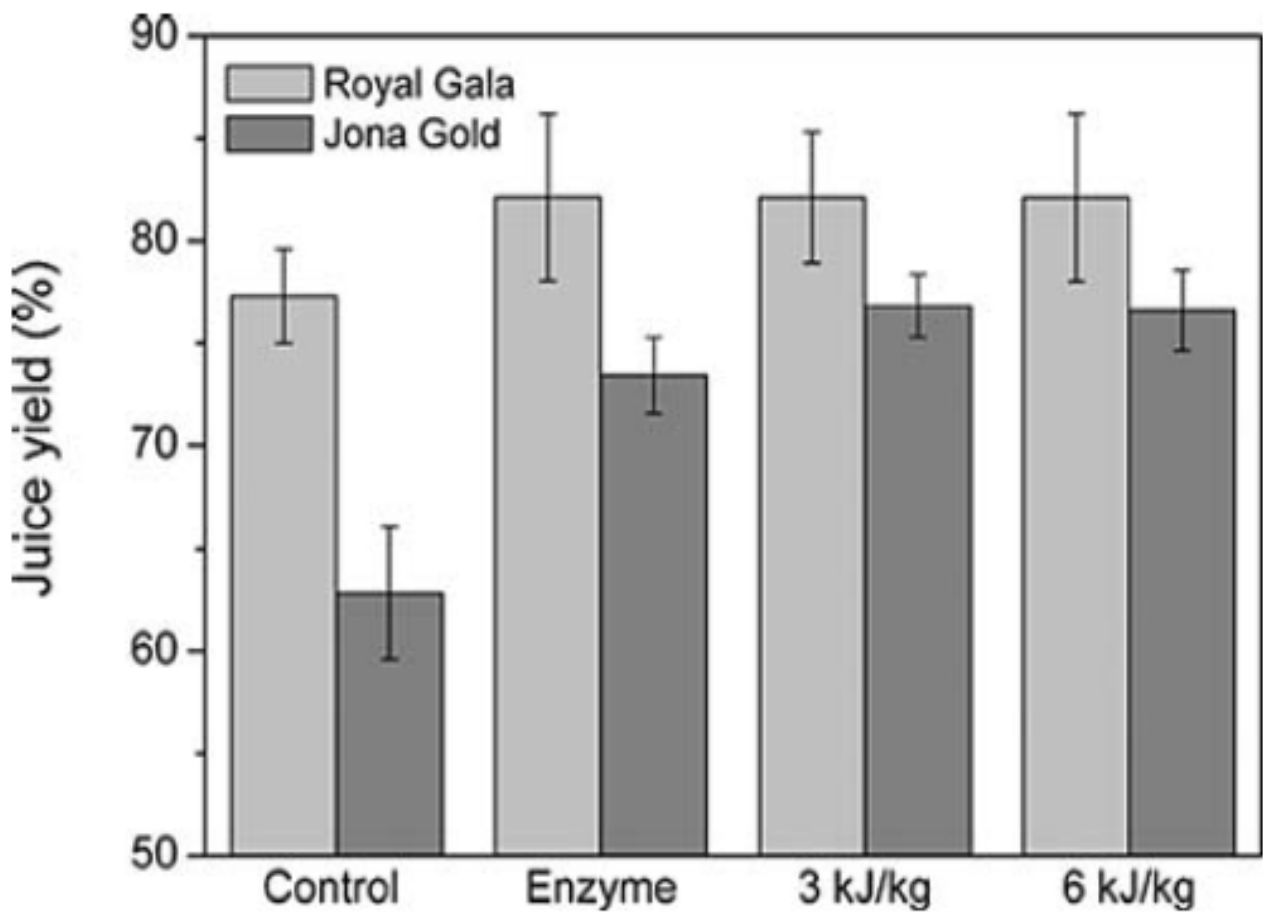
一些微生物或是植物細胞處於一部好的生長環境時，為了要繼續存活便會分泌一些抗免疫、抗氧化和具有生理活性的化合物等二級代謝物，而有些植物甚至會產生一些特殊風味化合物和色素(Mitchell *et al.*, 1996)。因此有科學家利用低電場強度PEF(0.5~2.4 kV/cm)作為一外在壓力，模擬一不適合生存之外在環境，迫使微生物或是植物細胞產生我們所需的二級代謝物質(Doenenburg and Knorr, 1993; Guderjan *et al.*, 2005)。

### (4) 肉類預處理

為了延長肉類食品的保存期限，通常是以鹽漬或添加一些抗菌物質如亞硝酸鹽類(nitrite)，或是將肉類風乾，降低其水活性，使微生物無法生長。使用低電場強度PEF(2 kV/cm)處理肉品後，可以使肉品嫩化、縮短醃漬所需時間以及提高肉品對鹽、亞硝酸鹽的攝入量(Hafsteinsson *et al.*, 2000; Toepfl and Heinz, 2007)，且經PEF處理後肉品在烹煮完後可保持較多水分。

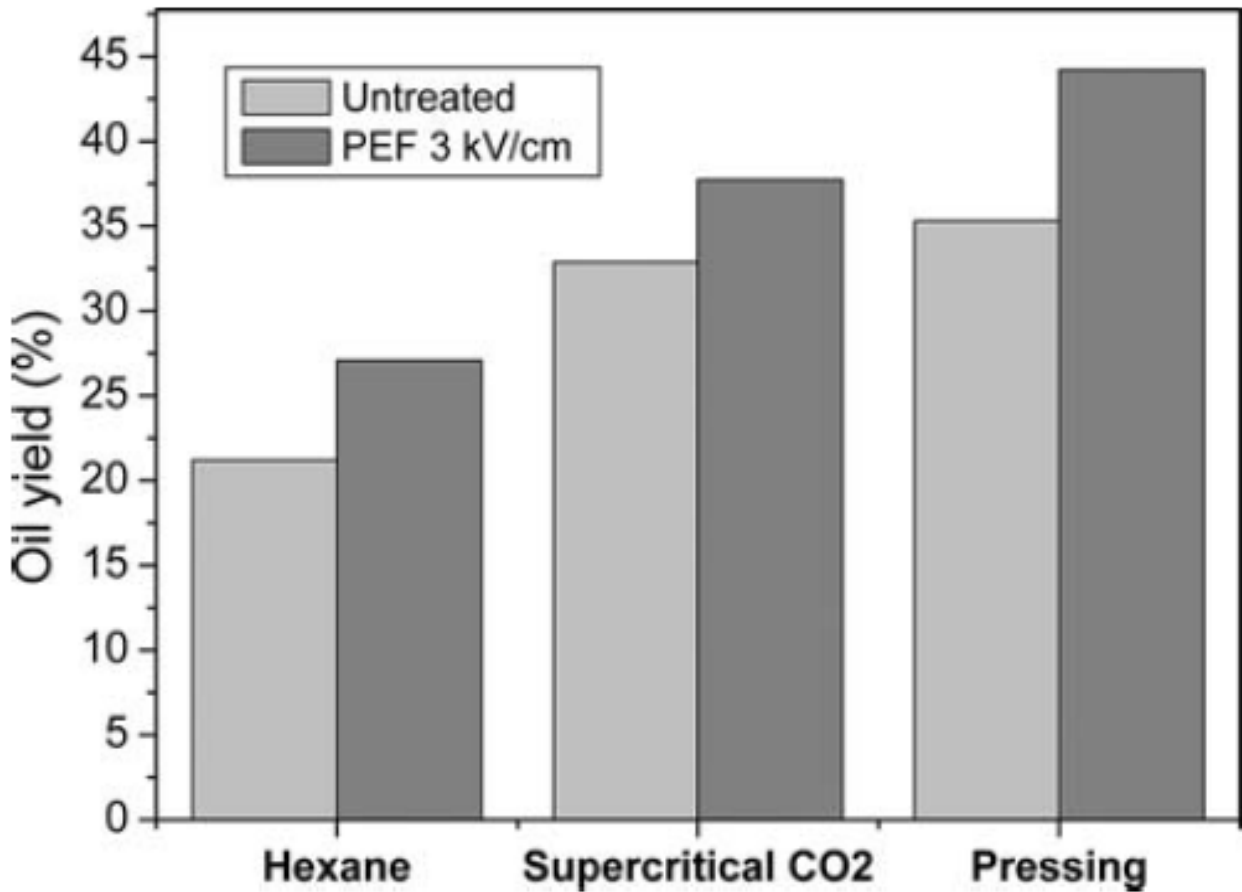
## (5) 廢水處理

利用中等電場強度PEF(15 kV/cm)處理廢水，可以改善沉澱物的聚集作用，使其均勻散布，並提高微生物的化學性氧氣需求(COD)釋放出有機物，以來改善消化作用並使其脫水(Loeffler *et al.*, 2001)，相較於傳統處理方法，高溫或超音波處理，施以PEF處理可以有效縮短操作時間。



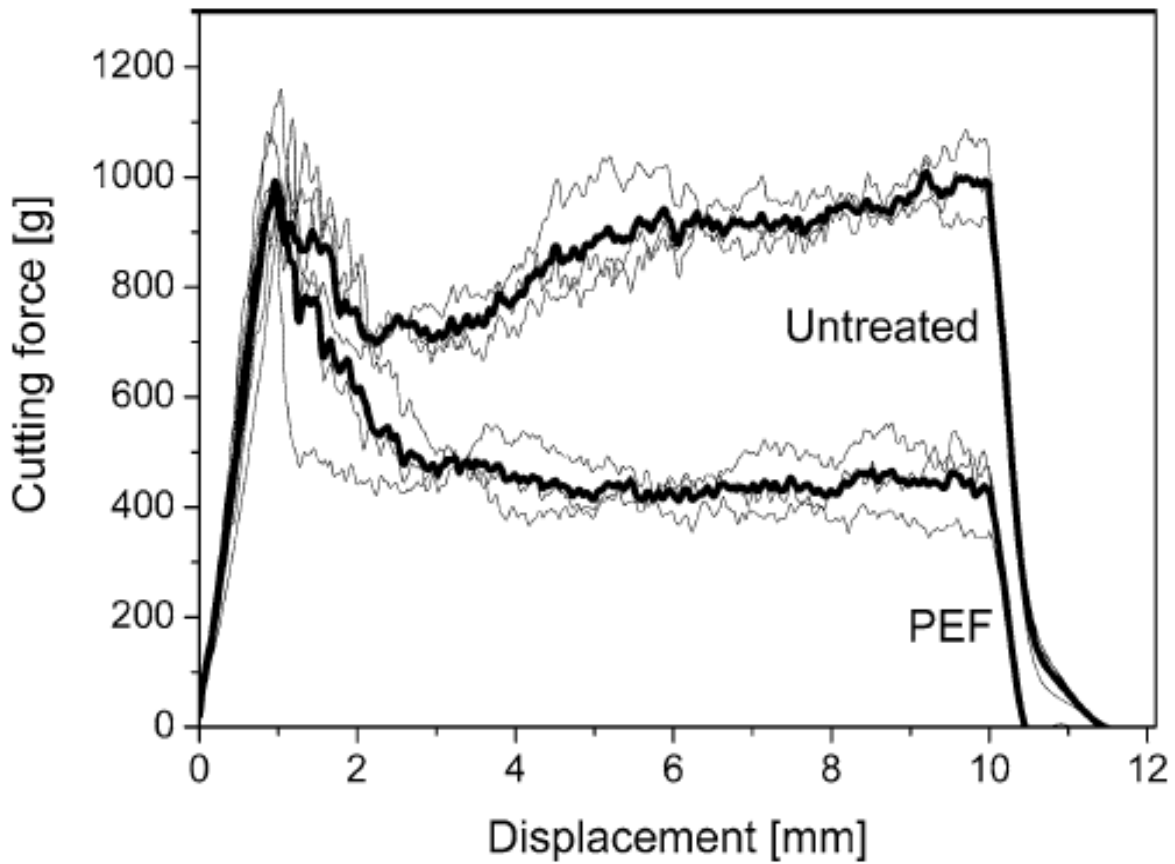
圖六、以PEF(2 kV/cm)對兩種品種蘋果果渣做預處理，比較在不同能量下與酵素處理後果汁的產量變化。

Fig. 6 Juice yield obtained in baling press from two apple varieties after PEF treatment at 2 kV/cm and different specific energy input in comparison to enzyme treatment and untreated sample.



圖七、搭配不同油脂萃取技術，比較未處理及施以PEF對玉蜀黍胚芽作前處理(3 kV/cm; 15 kJ/kg)後油脂產率變化。

Fig. 7 Oil yield comparison of untreated and electropermeabilized (3 kV/cm, 15 kJ/kg) maize germs extracted with different methods.



圖八、施以(1.2 kV/cm, 10 kJ/kg)之PEF處理後，對馬鈴薯組織的影響。

註:粗筆線條者為三重複樣品之平均。

Fig. 8 Impact of a PEF-treatment (1.2 kV/cm, 10 kJ/kg) on textural properties of potato tissue.

Bold lines show the average of three samples of untreated and PEF-treated potato .

## 二、PEF 應用於諾麗果汁的處理

### (一) 諾麗果汁的特性

諾麗果，學名為：*Morinda citrifolia* Linn.，屬於茜草科(*Rubiaceae*)、海巴戟天屬(*Morinda*)，俗名為 noni，在台灣文獻中多以檄樹為名將其收載，而其他俗名為水冬瓜、蘿梨、四季果和印度桑椹等。

檄樹為常綠小喬木，葉子為寬橢圓形，果實未成熟前為綠色，狀似手榴彈，是由許多小花聚集轉變而成之聚合果，成熟果實呈乳白色，但具令人不悅之氣味。此植物廣泛分布於印度至南太平洋群島，目前亦有引進至本島中南部地區種植，仲夏至秋季為其盛產期，目前台灣主要種植地區有雲林、台南、嘉義、屏東和恆春半島(Wang *et al.*, 2000 ; Yanine *et al.*, 2006 ; Nelson *et al.*, 2006)。

諾麗果早在二千年前就被當作是食用作物兼藥物，近幾年來則被美國食品藥物管理局(USFDA)認定為GRAS(Generally Recognized As Safe)作物(Levand and Larson, 1979)，諾麗果中含有許多營養成分以及對人體有益的化學物質，如：維生素、礦物質、胺基酸、類黃酮(flavonoids)、糖苷(glycosides)、維生素、蒽(anthraquinones)以及多元不飽和脂肪酸(Sang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000 ; 黃等, 2003)。此外，在諾麗果中亦含有豐富酚類化合物，如：damnacanthal、scopletin、morindone、alizarin、aucubin、nordamnacanthal、rubiadin和rubiadin-1-methyl ester，其中scopletin及其衍生物屬於香豆素(coumarin)類(Best, 1994)。



諾麗果汁在傳統上有許多傳說的功效，目經研究證實的有：

### 1. 抗氧化 (antioxidant)

諾麗果經由乙醇、乙酸乙酯萃取的化合物具有很好的抗氧化活性，在抑制脂質氧化部分，等量的萃取物甚至比  $\alpha$ -tocopherol、butylated hydroxyl toluene (BHT) 要來的好(Mohd *et al.*, 2001)。且諾麗果的根、葉子和果實以乙酸乙酯萃取物都具有很高的抗氧化性，而以甲醇萃取時則只有諾麗果根的萃取物有較好的抗氧化活性(Zin *et al.*, 2002)。

### 2. 抗微生物(anti-microbial)

諾麗果汁中的酚類化合物，如: acubin、L-asperuloside、alizarin、scopoletin，可以抑制 *Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Salmonella spp.*和 *Shigella spp.*等菌種的生長，且諾麗果乙醇和正己烷萃取物可以抑制 *Mycobacterium tuberculosis* 的生長(Saludes *et al.*, 2002)，亦有文獻指出成熟後的諾麗果會有較好的抑菌效果(Dittmar *et al.*, 1993)。

### 3. 抗癌症(anti-carcinogenic)

有研究指出，諾麗果中的多醣體，如: glucuronic acid、galatose、arabinose和 rhamnose可刺激T-cell和巨噬細胞(macrophage)生成，並產生白血球細胞生長激素(cytokines)，來提高免疫反應並具有抗癌症、抗腫瘤等功效(Hirazumi *et al.*, 1993；Hirazumi and Furusawa, 1999)。

#### 4. 降血壓(hypotensive)

研究指出諾麗果汁中之scopoletin 化合物具有舒緩平滑肌，並促使血管擴張而達到降血壓之功能(Ojewole and Adesina, 1983)，且果汁中的類黃酮類: apigenin、luteolin、kaempferol-3-O- $\alpha$ -arabinopyranoside、kaempferol-3-O- $\beta$ -galactopyranoside等，皆可抑制血管收縮素轉化酶(Angiotensin Converting Enzyme；ACE)，使angiotensin I 不被催化形成angiotensin II，達到降血壓的功效(Loizzo *et al.*, 2007)。

#### 5. 抗發炎(anti-inflammatory)

根據文獻記載，諾麗果汁中之主要抗炎症物質包括scopoletin、quercetin 及 ursolic acid，可有效地抑制發炎相關因子生成，如：細胞激素interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、interleukin-6 (IL-6)、前列腺素E2 (prostaglandin E2；PGE2) 和骨髓過氧化酶(myeloperoxidase；MPO)，以達到抗發炎功能(Yu *et al.*, 2004)。

### (二) 諾麗果汁發酵及其微生物變化

諾麗果汁是由諾麗果經自然發酵後再壓榨而成，成熟之諾麗果經過清洗風乾後，至於密閉容器中，於常溫發酵8~12週左右，滲出的果汁會由淺漸深，最後呈深褐色，此時再與軟化之果實一同壓榨成果汁。在民間認為發酵後的諾麗果汁有較好的生理功能，且以8~12週者為佳(Nelson and Elevitch, 2006)。

在傳統自然發酵過程中通常未添加菌醃，目前已有業者添加乳酸菌試圖改善果汁的風味，也有文獻指出添加 10%醋酸菌作為發酵菌醃並處於好氣發酵，可生產出抗氧化較佳的諾麗果汁(陳，2007)，但是在發酵過程中溫度是否會影響諾麗果成分、微生物的變化卻仍未有文獻報告。根據文獻記載，微生物在諾麗果在發酵初期會快速生長，至第二週開始維持穩定直至發酵結束(第 8 週)。其中乳酸菌在發酵第三週後開始急速減少，第五週時已偵測不到，在此篇研究有分析諾麗果汁中成分變化，但對於菌相分析則未做鑑定(Yanine *et al.*, 2007);而文獻(施，2009)中顯示諾麗果在沒有特別使用厭氧方式發酵時，其發酵過程中的優勢菌種為醋酸菌屬，其中包含 *Acetobacter*、*Gluconobacter*、*Gluconacetobacter*、*Acidomonas*、*Asaia*、*Kozakia* 等六種，其中又以 *Acetobacter sp.* 為主。但對於微生物在不同發酵溫度、時間其優勢菌種為何，則未有文獻報告。

發酵後的諾麗果汁需經過殺菌，目前諾麗果汁的商品如果粉、膠囊、茶包、果汁等，均以巴氏得低溫殺菌法(pasteurization; 63°C, 30 min.)來殺死產品中有害微生物，由於此殺菌方法需耗費較多時間，並可能會破壞機能性成份，因此本篇研究探討以 PEF 取代 pasteurization 的可行性。

## 參、實驗材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 試驗菌株

1. *Bacillus cereus* 10250 :購自食品工業發展研究所菌種中心。
2. *Escherichia coli* 11288: 購自食品工業發展研究所菌種中心。
3. *Staphylococcus aureus* 10779: 購自食品工業發展研究所菌種中心。

#### (二) 諾麗果原料

本實驗所採用之諾麗果原料購自雲林縣東豐景觀園藝公司與屏東縣珍果生技股份有限公司。

#### (三) 藥品及培養基

##### 1. 培養基

(1) PCA (Plate Count Agar); PDB (Potato Dextrose Broth); MRS broth (Man, Rogosa and Sharpe); FTM (Fluid Thioglycollate Medium); TSB (Tryptic Soy Broth); Agar, Granulated 均購自 Difco 公司

##### (2) 醋酸菌培養基

醋酸菌活化、計數及菌種保存的培養基為 Schramm & Hestrin (1954)

所發展之培養基，簡稱 S&H medium，其成分如下：

S&H broth:

Glucose	20.00g
Yeast extract	5.00g
Peptone	5.00g
Sodium phosphate	2.70g
Citric acid	1.15g
Water	1000 ml
Ph	6.0

2. 藥品

(1) 配置培養基所需藥品

NaOH (Sodium Hydroxide) 購自聯工試藥股份有限公司

Glucose 購自和光純藥工業株式會社

Yeast extract; Peptone 購自波士特生物科技股份有限公司

Sodium phosphate 購自林純藥工業株式會社

Citric acid 購自和光純藥工業株式會社

(2) 染劑

Rapid Gram Stain BA-40112; Spore Stain 購自啟新生物科技股份有限公司

(3) PCR 所需藥品

Primer (Forward and Reverse) 購自明欣生物科技股份有限公司

Taq DNA Pol 2.0x Red Master Mix 購自金萬林生物科技股份有限公司

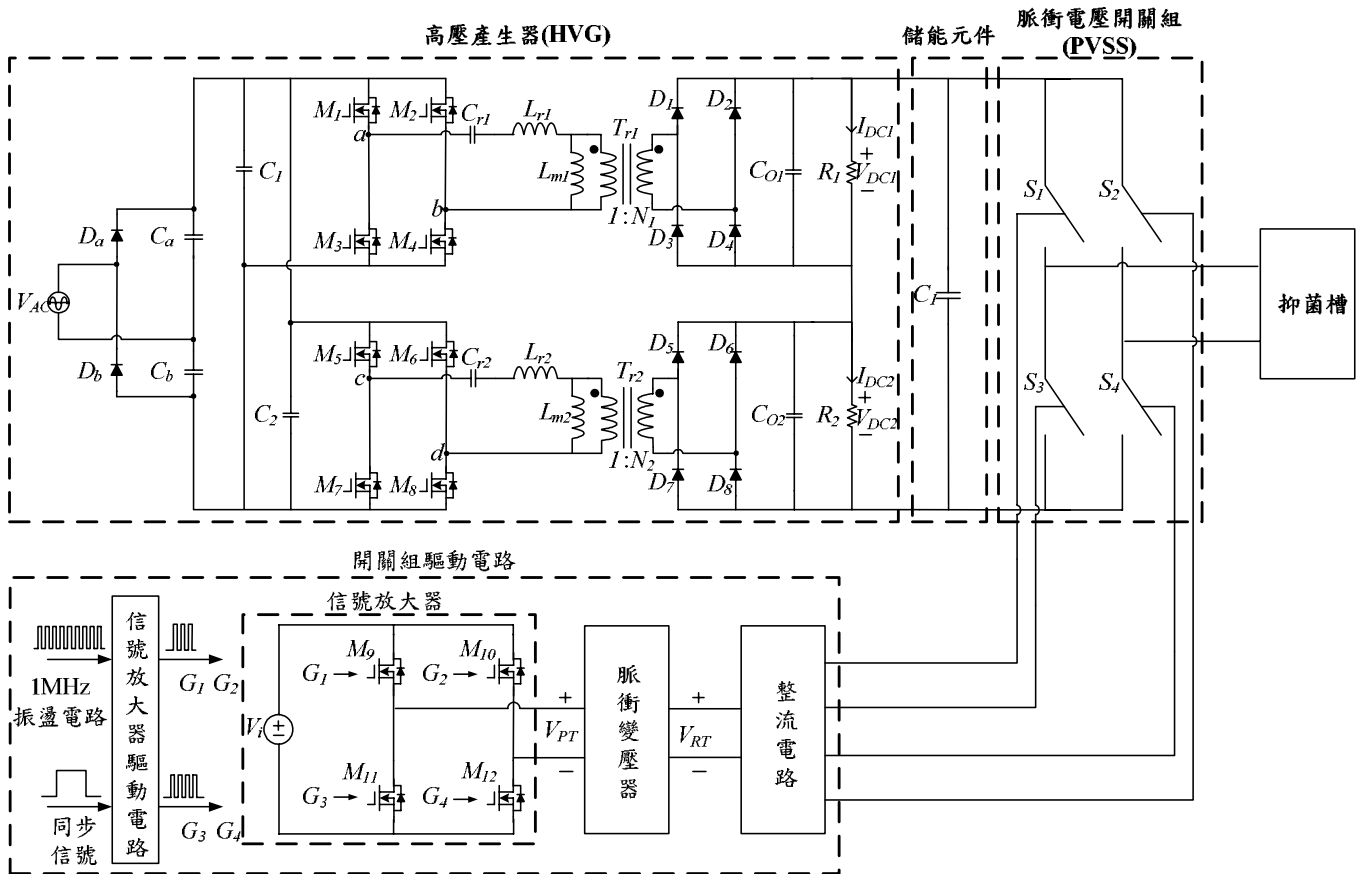
(4) 電泳所需藥品

Agarose I, Biotechnology Grade; 1kb Mass DNA ladder; EZ-Vision™ Three; 50X TAE buffer, Ultra Pure Grade 購自波士特生物科技股份有限公司

#### (四) 儀器設備

##### 1. PEF 產生器

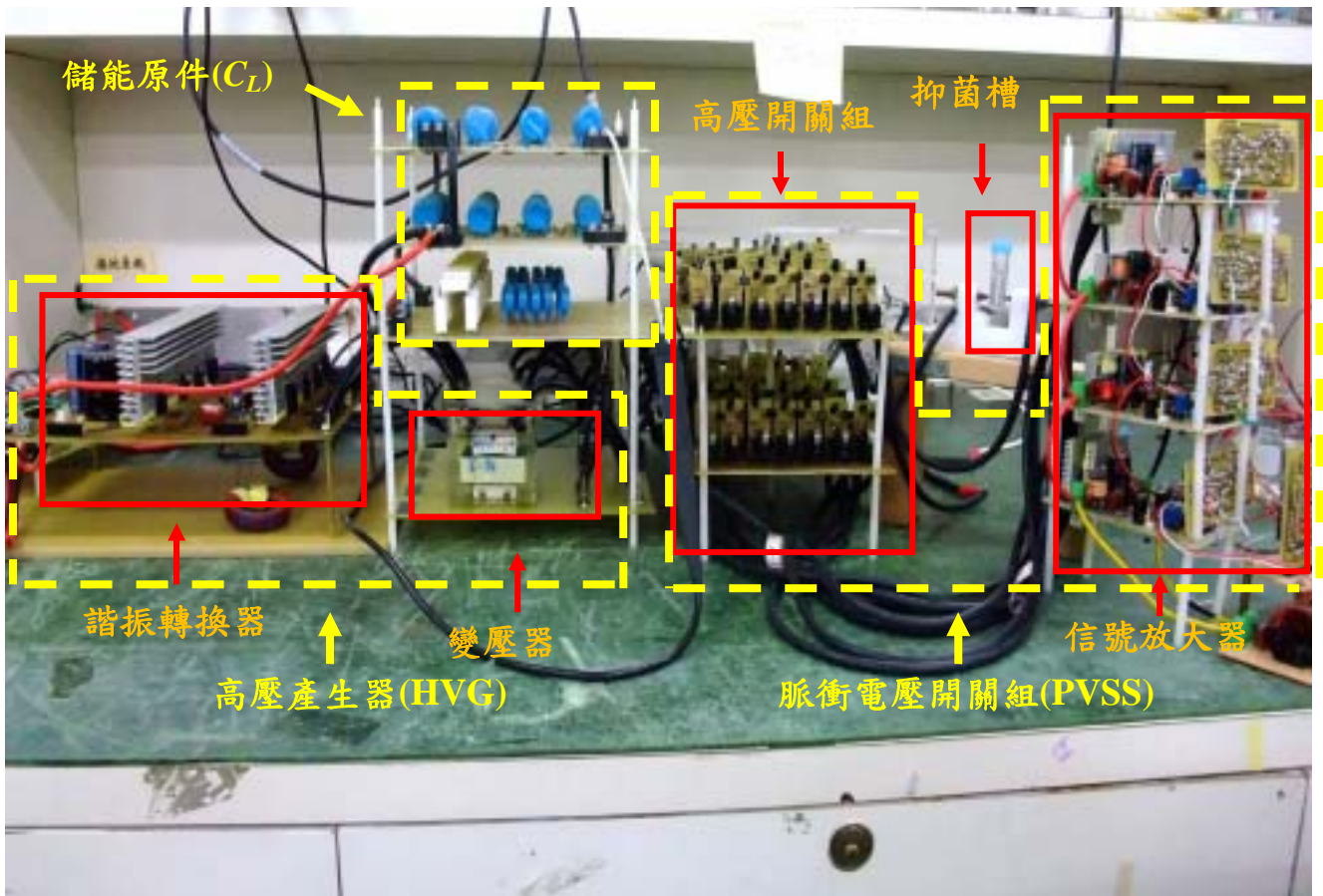
本實驗所使用之 PEF 裝置是由長庚大學電機系裝配，其中圖九是 PEF 儀器裝置的電路架構圖，圖十則是實際儀器架設配置圖，而儀器所使用的波形為方形波(square wave)，其圖譜見圖十一，該圖譜是由示波儀顯現，其中 C2 是量測電流(A)，其縱軸每格是 1 A; Ma. 是量測輸出電壓(kV)，其縱軸每格是 5 kV; 橫軸是量測時間，每格為 5  $\mu$ s，而脈衝寬度是由義隆公司開發的微處理機控制晶片搭配驅動放大器來做控制，其脈波寬度目前有 3、6、9、12  $\mu$ s 四種脈衝寬度。裝置中電路可分為前級與後級兩種，前級電路中，主要是以全橋式轉換器為基礎所構成的諧振轉換器，後級是以多顆開關串聯所構成的脈衝電壓開關組，其動作原理是前級使用市電交流輸入，經由倍壓整流電路以提供兩組諧振轉換器能量，電路中兩組諧振轉換器是使用前並後串的方式，把電壓由伏特(V)提升至千伏特(kV)為單位的直流電壓，之後經由後級電路切換成所需的脈衝電壓波形，而此波形可依照我們需求，利用義隆、驅動放大器設置脈衝寬度，最後再開始對樣品槽內的菌液電擊。而本實驗採用靜態樣品槽，樣品槽兩電極的距離為 4 mm，其外觀見圖十二。



圖九、寬脈波脈衝電場產生器架構圖

Fig. 9 Block diagram of wide pulses electric field generator.

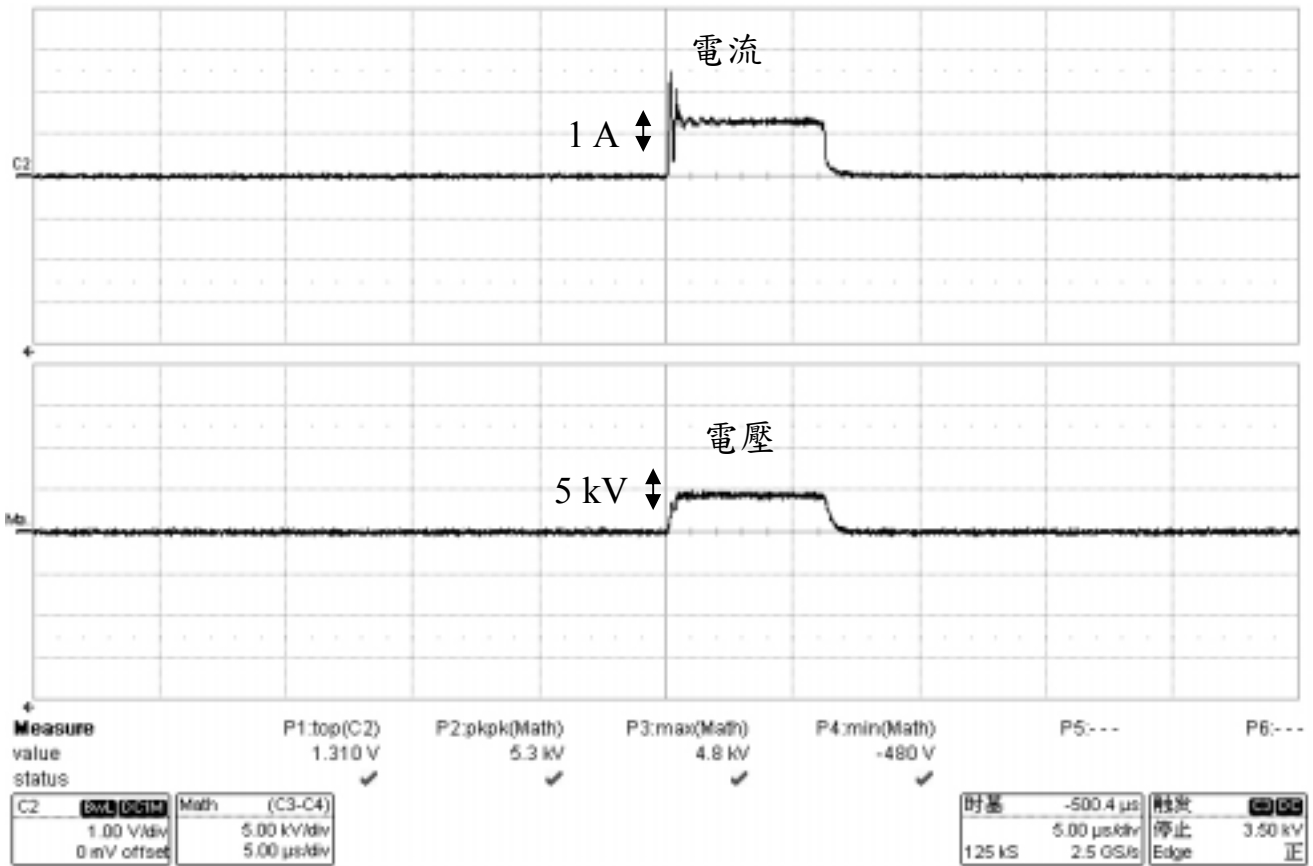
- 註：1.高壓產生器(HVG):包含兩組諧振轉換器。諧振轉換器因為有兩組所以有 8 顆開關(MOSFET)，可將輸入的市電由交流電轉成直流電形式，設定輸出電壓最大達 10 kV;  $V_{AC}$ :輸入的市電 110V 經由倍壓整流電路，而將電壓提升至 312V;(由於使用市電電壓是用於循環式的系統，而在本論文是探討不同電壓對於不菌的殺菌效果，所以輸入電壓目前是以直流電源供應器提供)。
- 2.儲能元件( $C_L$ ):主要是運用電容器的儲存與釋放電荷的特性，將高壓產生器的輸出電壓儲存至電容器中，以提供穩定的輸出波形。
- 3.脈衝電壓開關組(PVSS):由多顆低耐壓的功率金氧半場效電晶體 (Power Metal-Oxide-Semiconductor-Field-Effect-Transistor : Power MOSFET) 串聯而成，串聯後的開關如同一顆高耐壓開關，以用來產生高脈衝電壓。



圖十、寬脈波脈衝電場產生器硬體架設級配置圖。

Fig. 10 Schematic diagram of wide pulse electric field generator.





圖十一、寬脈波脈衝電場產生器輸出電壓及電流波形圖譜。

註: C2 是量測電流(A), 其縱軸每格 1 A; Ma. 是計算輸出電壓(kV), 其縱軸每格 5 kV; 橫軸為脈衝寬度, 每格 5 μs。

Fig. 11 Illustration of wide pulse forms from PEF.

Ps: C2 is measured electric current (A) and 1A per division for y-line; Ma. is measured voltage (kV) and 5 kV per division for y-line; the x-line is pulse width 5 μs per division for x-line.



圖十二、抑菌槽外觀。

Fig. 12 Appearance of cuvette.

## 2.傳統培養菌相分析

研究型顯微鏡 (Microscopy) : OLYMPUS BX50, Japan

彩色攝影機 (Color Video Camera) : SONY SSC-DC 83, Japan

電磁加熱攪拌器 (Hot Plate/Stirrer) : CORNING PC-420, USA

滅菌釜 (Autoclave) : YANG TA MIN INSTRUMENT CO., LTD. Model : YMT

pH meter : EUTECH instruments, Cyberscan 510, Singapore

烘箱 (Oven) : Risen, Taiwan

無菌操作台 (Laminar flow) : TH320, Taiwan

恆溫培養箱 (Incubators) : Sanyo, Japan

厭氧罐 (Anaeropack) : Oxido, Taiwan

電子式溫度計 (Digital Thermometer) : YOKOGAWA 2455, Japan

菌落計數器 (Colony counter) : SUNTEX 570, Taiwan

導電度計 (Conductivity meter) : SUNTEX SC-110, Taiwan

## 3.PCR 反應儀器

桌上型離心機 (Centrifuge) : UFO 2100, Taiwan

乾式加熱器 (Heating Block) : BIOER HB-100, Taiwan

微波爐 (Microwave oven) : 大同 TMO-2010, Taiwan

PCR instrument: AB Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Thermal Cycler,  
Singapore

DNA 電泳系統 (Electrophoresis System) : TOYOBO Gel Mate 2000, Japan

電泳膠片影像擷取系統 (Gel Electrophoresis Image system) : Gel 312, Taiwan

## 二、實驗方法

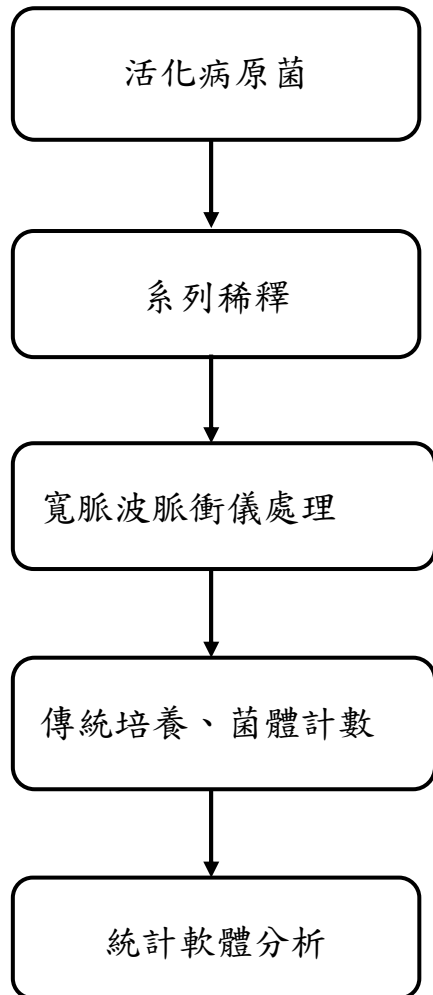
### (一) 實驗大綱

本實驗主要分成兩部分，首先是以常見的食品中毒病原菌為基準，測試長庚電機工程學系自行設計的脈衝產生器殺菌效果，處理模式為靜態模式，且紀錄該儀器對食品中毒病原菌的殺菌參數，未來可以依此數據設計連續式的脈衝產生器。

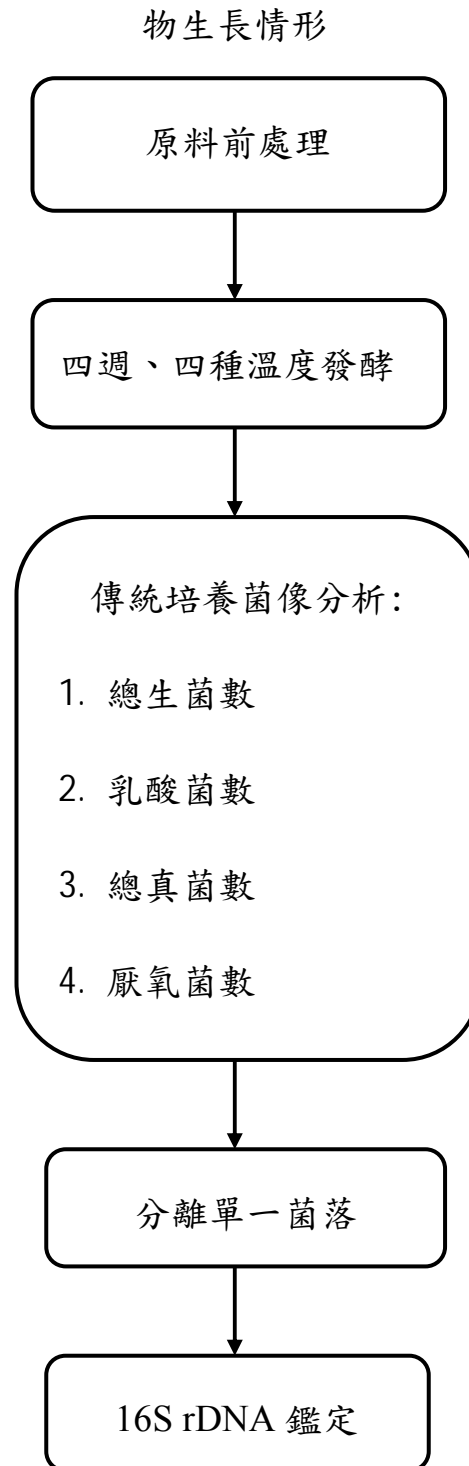
分析諾麗果在不同發酵溫度、時間下厭氣發酵時微生物生長情形，並且鑑定在不同時間點的優勢菌種，最後再以脈衝產生器處理該菌種，並觀察此儀器對該微生物的殺菌效果。

## (二) 實驗架構

### (1) PEF 對食品中毒病原菌的殺菌效果



### (2) 諾麗果於控溫發酵下微生物生長情形



### (三) 培養基之製備

#### 1. 液態培養基

秤取適量的 TSB 約 30g/L，加熱溶解後，取 5 ml 注入有螺旋蓋試管中，滅菌後(121°C, 15 min)冷卻備用。

#### 2. 平板培養基

(1) 秤取適量的 TSB (30 g/L) ; MRS (55 g/L) ; PDB (24 g/L) ; FTM (29.8 g/L) ; PCA (23.5 g/L)，並添加 15 g/L Agar，於血清瓶中加熱溶解。滅菌(121°C, 15 min)、冷卻至 45°C，再倒入無菌培養皿中，等待凝固後備用。

(2) 醋酸菌活化、計數及菌種保存培養基(Schramm & Hestrin, S&H medium)

Glucose	20.00g
Yeast extract	5.00g
Peptone	5.00g
Sodium phosphate	2.70g
Citric acid	1.15g
Water	1000 ml
pH	6.0
Agar	18.00g

加熱滅菌後(121°C, 15 min)、冷卻至 45°C，再倒入無菌培養皿中，等待凝固後備用。

### (四) 測試 PEF 的殺菌效率

#### 1. 病原菌活化及菌液製備

*Bacillus cereus* 10250、*Escherichia coli* 11288、*Staphylococcus aureus* 10779

自食品工業研究所中購得，將其接種在 5 ml TSB 液體培養基培養在 30°C; 37°C 皆

以 150 rpm 震盪培養 24 小時將其活化。之後再重新接種 1%菌液至新的 TSB 液態培養基，並以相同條件培養，此時菌數約為  $10^8\sim 10^9$  CFU/ml，再以導電度計偵測菌液導電度，約為 13~15 mS/cm。由於導電度值太高，導致 PEF 處理過程容易產生電弧及輸出電壓無法提高，因此將菌液稀釋至 1000 倍，此時導電度值為 37~39 mS/cm，菌數約為  $10^5\sim 10^6$  CFU/ml。

## 2. PEF 處理

### (1) 探討不同脈衝寬度、電場強度對病原菌的殺菌效果

取 1 ml  $10^3$  倍稀釋之菌液(*E. coli*、*S. aureus*、*B. cereus*)置於 4 mm 抑菌槽中，並以電子式溫度計偵測處理前菌液溫度並記錄。利用開關組電壓設定，將脈衝寬度分別固定在 3、6、9、12  $\mu$ s 下，90~170 伏特(V)經由變壓器加壓達到 3~6.5 千伏特(kV)電壓通電，電擊時間持續 3 秒，電擊完立刻以電子式溫度計偵測其溫度並記錄之，其餘電擊參數可參照附錄一、附錄二、附錄三。爾後菌液經由一連串系列稀釋，取 100  $\mu$ l 至 TSA 上，以 L 波棒塗抹均勻，再置於培養箱中 37°C，培養 18~24 小時；其中仙人掌桿菌是培養在 30°C，之後再用菌落計數器計算殘存菌數，將起始菌數扣除殘存菌數後取對數值即為該處理之殺菌效果(Microbial reductions)，計算公式如下：

$$\text{Microbial reductions} = \text{Log}_{10}(N/N_0) \quad (3-1)$$

N: 殘存菌數 (CFU/ml)

$N_0$ : 起始菌數 (CFU/ml)

最後再用統計軟體 Sigmaplot 10 做線性迴歸分析數據。

## (2) 探討不同微生物的臨界電場強度

根據文獻(Hüisher *et al*,1981)，方程式(3-2)可用來計算不同微生物致死的臨界電場強度(Critical electric field;  $E_c$ ):

$$\ln S = - b_E(E - E_c) \quad (3-2)$$

其中  $S$  是殘存菌數與起始菌數的百分比， $E$  是實際施加的電場強度， $E_c$  是微生物的臨界電場強度(kV/cm)， $b_E$  則是參數(cm/kV)。將不同脈衝寬度及電場強度配合產生的殺菌效果以 Sigmaplot 10 分析作線性迴歸分析。在相近的電場強度下，不同微生物種類、脈衝寬度可個別得到其迴歸方程式，再將迴歸方程式更換成方程式(3-2)的模式，即可得到微生物致死所需臨界電場強度( $E_c$ )及其他電氣參數該微生物的殺菌效率( $b_E$ )，例如:脈衝寬度或電流，其中  $E_c$  數值愈小，則表示該微生物愈容易被殺死，反之則表是微生物愈難被殺死; 而  $b_E$  則與  $E_c$  相反，其數值愈大表示對該微生物殺菌效果愈好。

## (3) 比較不同微生物致死所需能量

參考文獻(Jonathan *et al*,2008,and Zhong *et al*,2005)，建構一比能量換算方程式:

$$W_{Specific} = \frac{V \times I \times Tt}{\rho \times v} \quad (3-3)$$

$$Tt = \tau \times f \times t \quad (3-4)$$



其中方程式(5)的  $W_{Specific}$  (J/g)是輸入的比能量， $V$  (V)是單位脈衝下的電壓， $I$  (A)是單位脈衝下的電流， $Tt$  ( $\mu$ s)是電壓作用的時間， $\rho$  (g/cm<sup>3</sup>)是菌液的密度， $v$  (ml)是電壓作用的體積;而方程式(3-4)的  $\tau$  ( $\mu$ s)是單位脈衝下的寬度， $f$  (Hz)是施打的脈衝頻率， $t$  (sec.)是實驗操作時間，在本實驗中脈衝頻率( $f$ )固定為 1000 Hz.，操作時間( $t$ )則固定在 3 秒。由此公式可將不同脈衝寬度的殺菌結果合併成比能量模式，藉由此種模式可比較不同種類微生物致死所需能量的差異，同時也可以由此種模式變換不同殺菌參數，追求在最節省時間、其他成本條件下，達到最好的殺菌效果。

#### (4) 探討比能量公式之適用性

將 PEF 處理過程中不同脈衝寬度以及電場強度，利用方程式(3-3)所計算而得到單位一致之比能量(specific energy ;  $W_{specific}$ )(J/g)，並以該能量為基礎可於固定脈衝寬度下變換不同電場強度，以觀測在相同比能量下之殺菌效果是否有再現性。將脈衝寬度固定在 6  $\mu$ s，輸入電壓由 100~170 伏特(V)，經由高壓產生器昇壓到 4~6.1 千伏特(kV)電壓通電，電擊時間持續 3 秒，電擊完立刻以電子式溫度計偵測其溫度並記錄之。爾後菌液經由一連串系列稀釋，取 100  $\mu$ l 至 TSA 上，以 L 波棒塗抹均勻，在置於培養箱中 37°C，培養 18~24 小時;其中仙人掌桿菌是培養在 30°C，之後再用菌落計數器計算殘存菌數，並以方程式(3-1)計算其殺菌效果，最後再用統計軟體 Sigmaplot 10 分析數據。

#### (四) 諾麗果於不同溫度、時間發酵之微生物變化

##### 1. 原料前處理

由屏東縣珍果生技股份有限公司購得諾麗果實，將其以清水清洗去除果實表面灰塵，之後置於鐵盤上在陰涼處自然風乾數日待所有果實成熟，見圖十三。



圖十三、熟成的諾麗果外觀。

Fig.13 Appearance of mellow noni.

## 2. 不同時間下控溫發酵

收集已熟成果實並將其切成四等份，取等重量個別置入三個透明密封罐中，每桶體積約 5 分滿，平均重量 450 公克。之後置入商用食品級脫氧包（吸氧量 350 mL），放於秤盤並置樣品上緊閉罐蓋置於設定溫度（25、35、45、55°C）之恆溫培養箱中，進行 1、2、3、4 週等不同時間控溫發酵。

## 3. 傳統培養菌相分析

### (1) 總生菌數、總真菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之分析

由於諾麗果發酵前果汁產量極低，因此將發酵前諾麗果肉均勻攪拌後取 0.5 g 果肉，將果肉直接塗抹在 PCA、PDA、MRS 三種固態培養基上，PCA 於 30°C 下倒置培養 2 天；PDA 於 25°C 下倒置培養 3~5 天；MRS 於 30°C 下倒置培養 2 天；而發酵完成之諾麗果經均勻攪拌後，個別取 1 ml 果汁分別塗抹在 PCA、PDA、MRS、FTMA 四種固態培養基，PCA、PDA、MRS 培養方法與相同；FTMA 加入厭氧包後於 30°C 下倒置培養 2 天，觀測諾麗果未發酵、厭氧發酵後的總生菌數、總真菌數、乳酸菌數、厭氧菌數（菌落數以 25-250 個之稀釋倍數為最佳稀釋倍數），單位以 CFU/ml 表示。菌數計算方式如下：

$$\text{Colony-Forming Units (CFU/ml)} = \frac{(\text{Number of colonies})/N}{0.1 \times \text{Dilution}^*} \quad (3-5)$$

N: 重複數

0.1: 塗抹法菌液取用量

Dilution\*: 稀釋倍數(10<sup>\*</sup>)

之後再以統計軟體 Sigmaplot 10 分析不同發酵時間、溫度下，微生物生長變化。

## (2) 分離單一菌落

將控溫及非控溫發酵下，PDA、PCA、MRS、FTMA 四種固態培養基中不同型態(大小、形狀、顏色)之菌落挑出，將主要優勢菌種標記後，個別塗抹至相對應的固態培養基中培養，培養完成後，再以三區劃線法接種於新的培養基中，確認是否為單一菌株，若否則重複上述步驟直至為單一菌落為止。分離出的單一菌株將用來進行後續的菌種鑑定分析。

## 4. 以 PCR 分析、鑑定菌相

### (1) 微生物 genomic DNA 萃取

萃取微生物 genomic DNA 有許多方法，本篇研究是採用高溫加熱破壞微生物細胞壁再萃取其 genomic DNA。操作步驟為，先取 1 loop 純化後的單一菌落溶解至 200  $\mu$ l 無菌水中，於 99 $^{\circ}$ C 下加熱 15 分鐘，之後以 13,000 rpm 轉速離心 5 分鐘，吸取上清液至新的微量試管(1.5 ml)中，儲存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱備用。

### (2) PCR 條件建立

本篇研究所採用的兩組引子(primer)是參考文獻(John *et al.*,2005)，可用於鑑定絕大多數細菌，Primer 序列如下：

16S rDNA primer			
Primer	Sequence (5'-3')	Target <sup>a</sup> site	Production length
11F	GTTTGATCCTGGCTCAG	16S (338~518)	1515 bp
1515R	GGYTACCTTGTTACGACTT		

本實驗中所使用的 PCR 反應器為 Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore)，所加入的反應試劑是購自金萬林生物科技股份有限公司的 Taq DNA Pol 2.0x Red Master Mix。總體積為 40µl 的 PCR 反應試劑中，包含 Template DNA 為 4µl，Forward primer (10 倍稀釋) 2µl、Reverse primer(10 倍稀釋) 2 µl、Taq DNA Pol 2.0x Red Master Mix 20 µl 以及 14 µl 的去離子水。PCR 條件則是根據文獻進行本實驗 PCR 條件之建立。條件如下表所示：

表三、PCR 過程條件設定。

Table 3. The conditions of PCR processing.

Temperature		Cycle numbers	Reaction
Stage 1	94°C , 5min.	1 cycle	Denature
Stage 2	94°C , 30sec.	5 cycle	Denature
	52°C , 50sec.		Annealing
	72°C , 1min.		Extending
Stage 3	94°C , 30sec.	30 cycle	Denature
	55°C , 50sec.		Annealing
	72°C , 1min.		Extending
Stage 4	72°C , 10min.	1 cycle	Extending

### (3) PCR-16S rDNA 片段瓊脂膠體電泳檢視

此一步驟目的，是要確認 PCR 反應後的產物，檢視 PCR 反應進行的情況。

本篇研究所使用之引子(11F)進行 PCR 反應後，會產生約 1515 bp 的核酸產物，因此使用 1%濃度的 agarose gel 進行電泳。瓊指膠體電泳進行步驟為:取 0.5 g agarose 粉末，加入 50 ml 的 0.5 X TAE buffer(由 50X TAE buffer 稀釋而成)，以微波爐加熱至完全溶解，降溫至 40 ~ 50°C 時倒入電泳膠片模型中等待其凝固。凝固後置於裝滿 0.5 X TAE buffer 的水平式電泳槽(TOYOBO Gel Mate 2000, Japan)中，將 3-5  $\mu$ l DNA 產物與 1  $\mu$ l EZ-Vision™ Three 均勻混合後注入膠體中，再以 100 伏特電壓進行電泳，時間為 50 分鐘。之後將膠片取出置於電泳膠片影像擷取系統(Gel 312, Taiwan)中，以紫外光照射，利用核酸與染劑鍵結後會吸收 312 nm 波長紫外光特性，由亮帶出現的位置與同時進行電泳的 DNA marker 比對，即可知道分子量大小與產物的專一性，藉此評估 PCR 條件是否適當以及引子專一性是否足夠。確定 DNA 產物分子量大小後，再將產物送至明欣科技股份有限公司定序，之後再把定序結果以 NCBI 網站中 Blast 功能與網站中資料庫比對，分析該段序列為何種菌屬的微生物，序列比對的相似度皆在 98% ~ 100%，最後再用 CLC Main Workbench 5.0 軟體搭配已確定菌種之序列來分析比對該序列為何種菌種，並以無權重群組算數平均法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means, UPGMA)繪製演化樹。

UPGMA 的原理是利用核苷酸或胺基酸的置換速率與親緣遠近大約成正比的特性，使用算數平均數來計算物種之間的距離，此法採用一系列漸進的雙序列並列分析來做。在程式啟動後，會先將各序列兩兩比對，以找出未來做進一步並列

的順序。原則是先將最相似的序列排列在一起，變為一群 (cluster)，然後再將剩餘序列中與這兩個序列最相似的一個，與這兩個排好的序列群做並列分析 (Sneath and Sokal, 1973)。

最後再從鑑定出的菌種中，挑選出在諾麗果發酵過程中的優勢菌種，用 PEF 施以相近的電氣參數，觀察 PEF 對該菌種的殺菌效果，並且與食品中毒病原菌相比較 PEF 對其殺菌效果，探討不同菌種間殺菌效果的差異性。

## 肆、結果與討論

### 一、PEF 對食品中毒病原菌的殺菌效果

本實驗以大腸桿菌(*Escherichia coli*)、金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、仙人掌桿菌(*Bacillus cereus*)等常見食中毒病原菌，測試長庚大學電機系自製的脈衝電場產生器(Pulsed electric field generator; PEFG)的殺菌效果，並針對不同種微生物，分析電場強度下不同脈衝寬度的殺菌效果，並藉由不同脈衝寬度的殺菌效果配合方程式(4)評估不同微生物之臨界電場強度(Critical electric field;  $E_c$ )，然後再以方程式(3-3)、(3-4)討論不同微生物之致死能量，以及評估方程式(3-3)之適用性。

#### (一) 不同脈衝寬度對殺菌效果之影響

將大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌接種置 TSB 液態培養基，並置於 37°C；仙人掌桿菌 30°C 以 150 rpm 震盪 24 小時，再將其系列稀釋至  $10^3$  倍，使其導電度由 15 ~ 16 mS/cm 降至 43 ~ 48  $\mu$ S/cm，個別將三種微生物於不同脈衝寬度 (3、6、9、12  $\mu$ s) 下，施以不同電場強度處理，處理過程之電氣參數，見附錄一、附錄二、附錄三。將處理完之菌液各取 100  $\mu$ l 均勻塗抹在固態培養基 TSA 中，並將其置於 37°C；仙人掌桿菌 30°C 培養 18 ~ 24 小時，再以菌落計數器計算其殘存菌數，搭配方程式(3-1)換算其殺菌效果，最後再以 Sigmaplot 10 作線性回歸分析。

對大腸桿菌而言，在 3、6、9、12  $\mu$ s 四種脈衝寬度並個別施以電場強度 14.63、

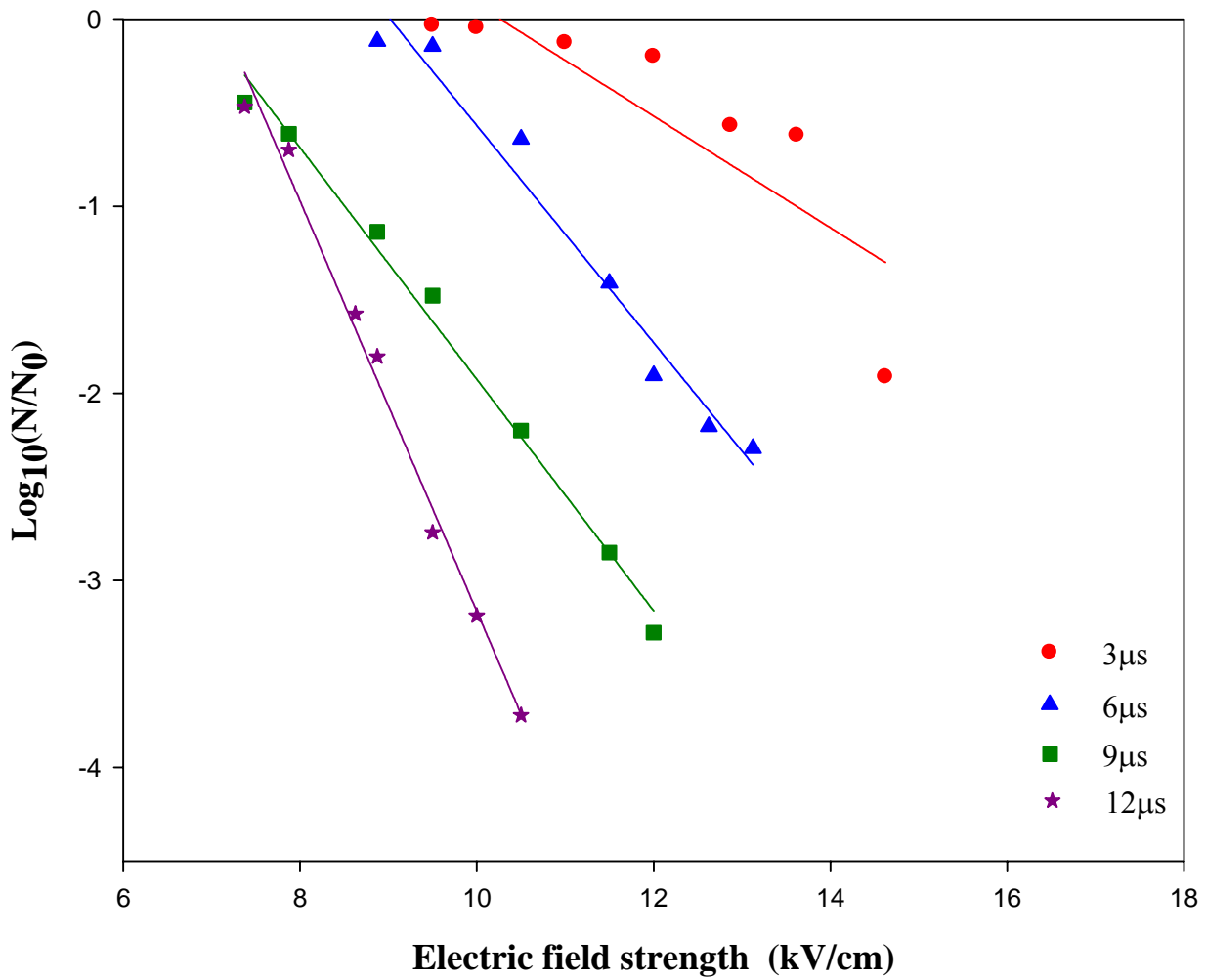


13.13、12、10.5 kV/cm 之 PEF 處理，可得到最大殺菌效果，分別是降低菌數 1.91、2.29、3.28、3.72  $\log_{10}$  值，見圖十四。PEF 對金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌亦有相似的殺菌效果，但受限於電擊槽材質，金黃葡萄球菌的殺菌結果只有在 3、6、9  $\mu\text{s}$  三種脈衝寬度下處理，當施加的電場強度為 15.75、13.75、12.5 kV/cm 時，三種脈衝寬度可得最大殺菌效果，分別是降低 0.19、3.68、3.77  $\log_{10}$  值，見圖十五；而仙人掌桿菌經 PEF 處理，在電場強度為 16.13、13.5、11.38、9.75 kV/cm 時，在四種脈衝寬度(3、6、9、12  $\mu\text{s}$ )的最大殺菌效果分別是降低 2.40、3.70、4.28、4.48  $\log_{10}$  值，見圖十六。由上述結果顯示 PEF 的殺菌效果會隨著脈衝寬度的增加而提高，且隨著脈衝寬度的增加，使用較低的電場強度亦可達到相同甚至是更好的殺菌效果。

在本實驗中脈衝頻率( $f$ )、操作時間( $t$ )分別固定為 1000 Hz、3 秒，並根據方程式(3-4)換算成 PEF 處理過程的處理時間( $Tt$ )。當脈衝寬度增加時，處理的時間也會隨之延長，經換算後 3、6、9、12  $\mu\text{s}$  四種脈衝寬度在整體處理過程的處理時間( $Tt$ )分別為 0.009、0.018、0.027、0.036 秒，因此殺菌效果亦會隨之增加。但有文獻記載，在低脈衝頻率時，脈衝頻率高低對 PEF 殺菌並無顯著影響( $f$ :100、175、250 Hz)，且在低脈衝頻率、高脈衝寬度時則有較好的殺菌效果(Sobrinho-López *et al.*,2006);同時，亦有文獻指出較高的脈衝頻率( $f$ : 828、1035、1242、1449 Hz)俱有一定的殺菌效果(Zhong *et al.*, 2005)。因此本實驗中是將脈衝頻率固定在 1000 Hz。有文獻指出，當電場強度固定( $E$ :40 kV/cm)時，脈衝寬度(0.3 ~ 2  $\mu\text{s}$ )長短不

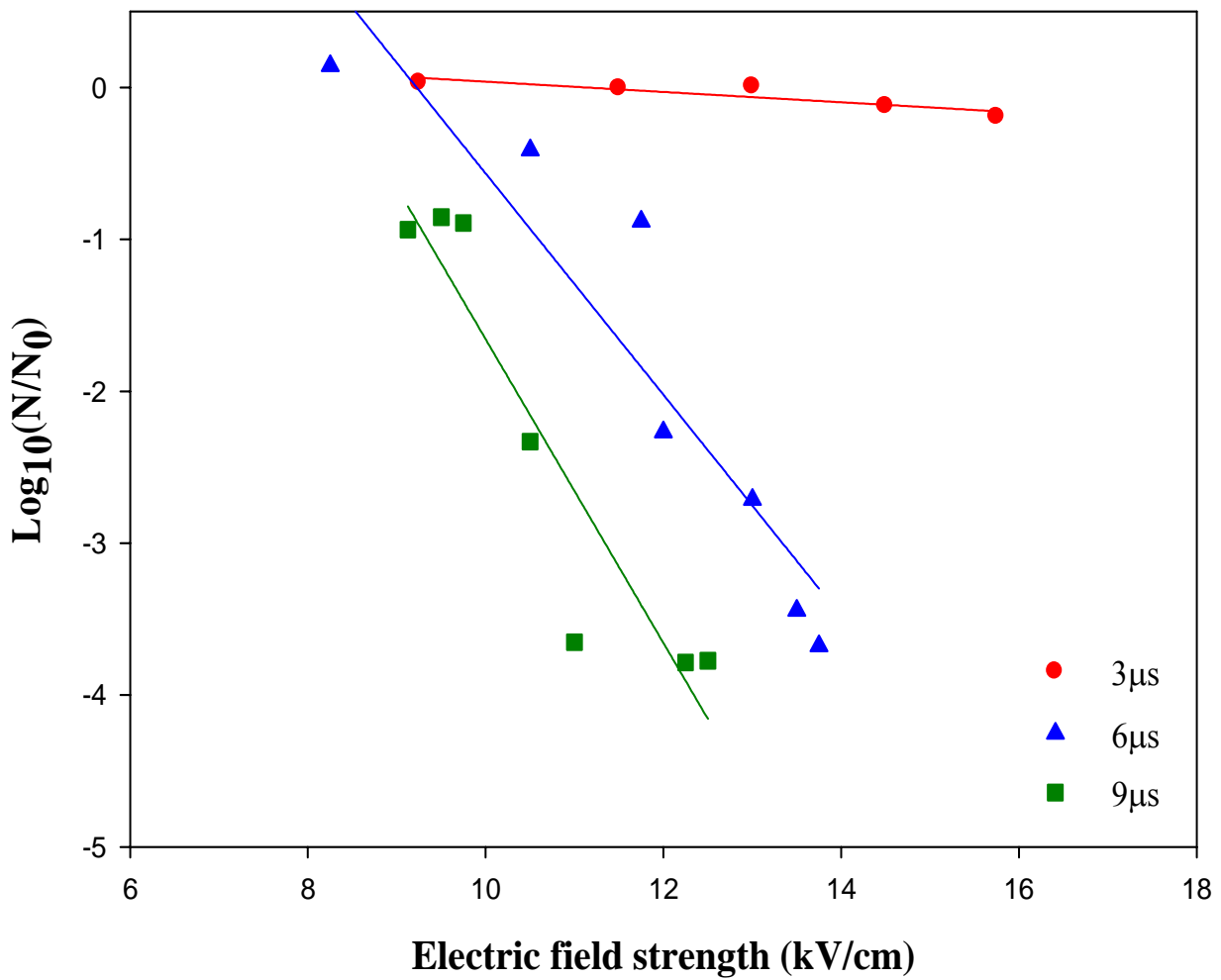
影響殺菌效果(Fox *et al.*, 2008)，這與本實驗的結果有出入，是因為文獻中的脈衝頻率( $f$ )只有 25 Hz，且脈衝寬度變化量並沒有很大，因此才會顯示脈衝寬度高低不影響整體的殺菌效果。

除此之外，當脈衝寬度、處理時間分別為 12 $\mu$ s、0.036 秒時，大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌在 10.5、12.5、9.75 kV/cm 電場強度下，PEF 的殺菌效果分別降低 3.72、3.77、4.48  $\log_{10}$  值；相較於之前文獻，大腸桿菌在電場強度、脈衝寬度、處理時間分別為 35 kV/cm、4.0  $\mu$ s 和 1250  $\mu$ s 下，可降低 3.91  $\log_{10}$  值 (Jonathan *et al.*, 2007)，金黃葡萄球菌在 35 kV/cm、3.7  $\mu$ s 和 459  $\mu$ s 下，則下降 3.7  $\log_{10}$  值 (Evrendilek *et al.*, 2004)，而仙人掌桿菌於 25 kV/cm、2.0  $\mu$ s 和 100  $\mu$ s 下，降低 1.3  $\log_{10}$  值 (Cserhalmi *et al.*, 2002)。在本實驗中大腸桿菌、金黃葡萄球菌與文獻的殺菌效果相近，而仙人掌桿菌的殺菌效果更是明顯大於文獻；不過上述三個文獻皆是將病原菌接種於液態食品中，再以同軸連續式 PEF 處理後所得殺菌效果，因此殺菌效果會受到流速(ml/min.)、導電度(mS/cm)影響，且本實驗中的處理時間也遠大於文獻數值，導致文獻中的殺菌效果比靜態式樣品處理槽來的差 (Zhong *et al.*, 2005)；雖然在本實驗中處理時間較長，但殺菌所需的電場強度則是低於文獻數值(< 13 kV/cm)。



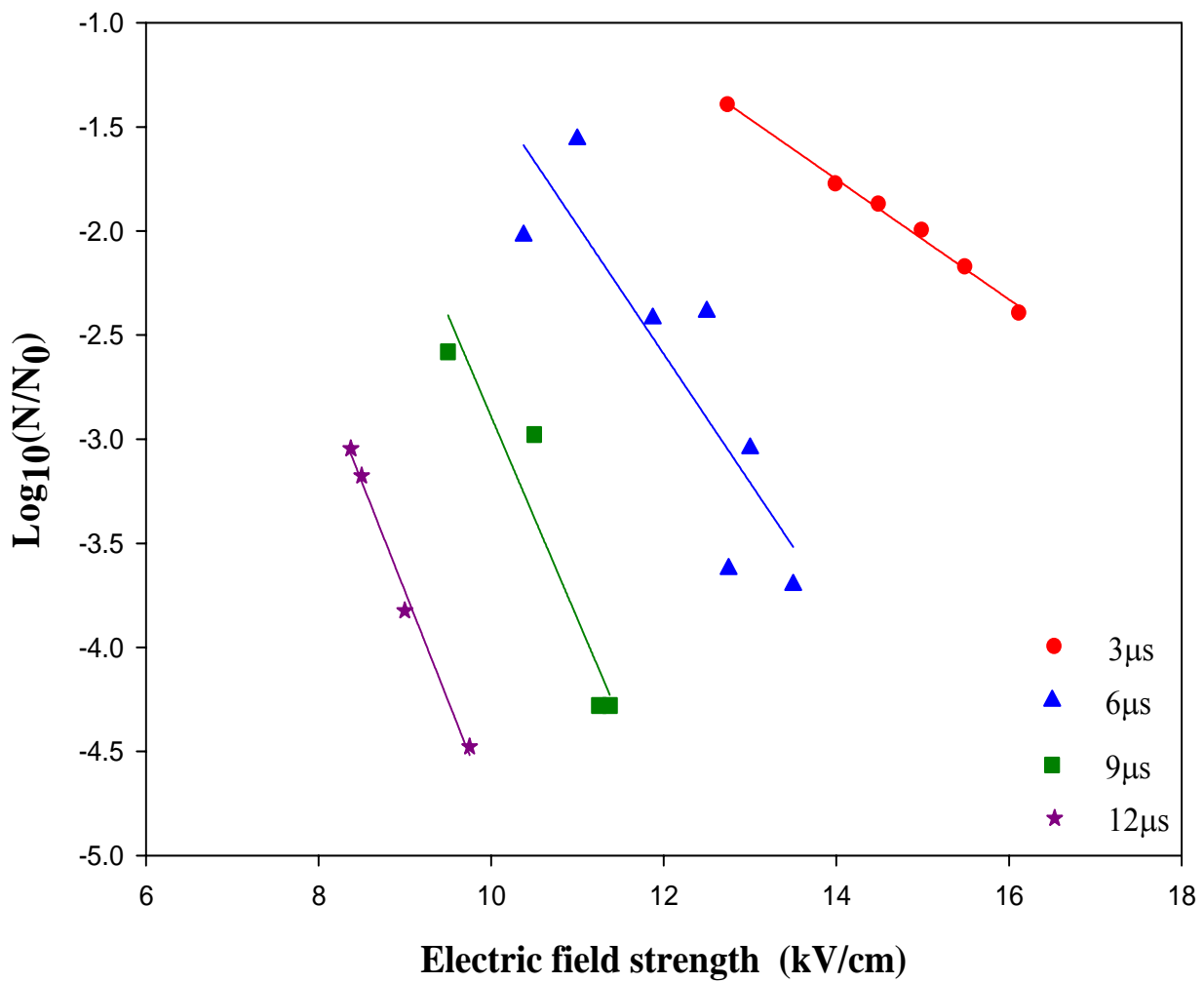
圖十四、不同脈衝寬度處理下電場強度(kV/cm)對大腸桿菌的影響。

Fig. 14 Effect of the pulse width on the inactivation of *Escherichia coli* under various electric field strengths.



圖十五、不同脈衝寬度處理下電場強度(kV/cm)對金黃葡萄球菌的影響。

Fig. 15 Effect of the pulse width on the inactivation of *Staphylococcus aureus* under various electric field strengths.



圖十六、不同脈衝寬度處理下電場強度(kV/cm)對仙人掌桿菌的影響。

Fig. 16 Effect of the pulse width on the inactivation of *Bacillus cereus* under various electric field strengths.

## (二) 殺菌效果的臨界電場強度

將 PEF 對三種微生物在不同脈衝寬度殺菌結果作線性回歸，可得回歸方程式(4-1)~(4-11)，其中方程式(4-1)~(4-4)是屬於大腸桿菌的殺菌結果，相對應的脈衝寬度分別 3、6、9、12  $\mu\text{s}$ ，見圖十四；方程式(4-5)~(4-7)則是金黃葡萄球菌在 3、6、9  $\mu\text{s}$  三種脈衝寬度的殺菌果，見圖十五；而仙人掌桿菌在 3、6、9、12  $\mu\text{s}$  四種脈衝寬度下，可得到方程式(4-8)~(4-11)殺菌結果，見圖十六。實驗結果繪製成圖後，若有正相關或負相關的趨勢時，可以再加上一條趨勢線，且在此分佈趨勢中所有的點到此條趨勢線的距離平方和是最短的，而此直線即為該數據之線性回歸方程式( $y = ax + b$ )；其中  $a$  是斜率， $b$  則是截距， $R^2$  則是該方程式的相關系數，當  $R^2$  數值愈接近 1，表示所分佈的點與該線性方程式愈接近，即操作過程中的誤差值愈小。

透過方程式中的斜率變化可知殺菌效果會隨著脈衝寬度的增加而提高，且經文獻(Hüisher *et al.*, 1981 ; Zhong *et al.*, 2005)證實，方程式(3-2)：

$$\ln S = -b_E(E - E_c) \quad (3-2)$$

是較適合用來預估不同種微生物的臨界電場強度( $E_c$ )。

將下述回歸方程式模式轉換成方程式(3-2)的模式，即可個別得到大腸桿菌、金黃葡萄球菌和仙人掌桿菌在不同脈衝寬度下，致死所需臨界電場強度為何，見表四 (A)、(B)、(C)，由於本實驗所得之回歸方程式是以  $\log_{10}$  表示，並非方程式(3-2)顯示的自然對數( $\ln$ )表示，因此轉換過程需再乘以 2.302。

$$y = -0.2981x + 3.059 \quad R^2 = 0.72 \quad (4-1)$$

$$y = -0.5799x + 5.230 \quad R^2 = 0.97 \quad (4-2)$$

$$y = -0.6187x + 4.263 \quad R^2 = 0.99 \quad (4-3)$$

$$y = -1.097x + 7.8030 \quad R^2 = 0.99 \quad (4-4)$$

$$y = -0.0339x + 0.377 \quad R^2 = 0.80 \quad (4-5)$$

$$y = -0.7287x + 6.721 \quad R^2 = 0.87 \quad (4-6)$$

$$y = -0.9998x + 8.340 \quad R^2 = 0.87 \quad (4-7)$$

$$y = -0.2886x + 2.289 \quad R^2 = 0.99 \quad (4-8)$$

$$y = -0.6176x + 4.820 \quad R^2 = 0.74 \quad (4-9)$$

$$y = -0.9719x + 6.828 \quad R^2 = 0.91 \quad (4-10)$$

$$y = -1.051x + 5.7310 \quad R^2 = 0.99 \quad (4-11)$$

在 PEF 處理過程中，臨界電場強度會隨脈衝寬度提升而降低，如大腸桿菌，脈衝寬度由 3  $\mu$ s 提升至 12  $\mu$ s 時，臨界電場強度則由 10.26 降至 7.12 kV/cm; 金黃葡萄球菌的脈衝寬度由 3  $\mu$ s 提升至 9  $\mu$ s 時，臨界電場強度則由 11.12 降至 8.34 kV/cm; 而仙人掌桿菌脈衝寬度由 3  $\mu$ s 提升至 12  $\mu$ s 時，臨界電場強度則由 7.93 降至 5.45 kV/cm，這也再度證明提高脈衝寬度可更有效殺死微生物。至於  $b_E$  (cm/kV) 數值則是與  $E_c$  相反，當  $b_E$  愈大表示在 PEF 處理過程中，提高該殺菌參數會有較好的殺菌結果，見表四 (A)、(B)、(C)。在之前文獻則有探討脈衝頻率對臨界電場的影響 (Zhong *et al.*, 2005)，當脈衝頻率由 207 Hz 提高至 1449 Hz 時，臨界電場則由 4.06 kV/cm 降至 1.61 kV/cm。文獻中是將處理電場固定在 20 kV/cm，而本實驗中處理電場最大為 16.13 kV/cm，且脈衝頻率固定為 1000 Hz，相形之下，本實驗中微生物致死所需的臨界電場強度會高於文獻記載的數值。

此外，臨界電場強度大小亦會取決於作用微生物的形狀、半徑大小以及細胞壁結構，根據方程式(2-1):

$$\Delta\phi_M = -f(A)A_F E \quad (2-1)$$

其中  $\Delta\phi_M$  是細胞膜上形成孔洞所需臨界電壓;  $f(A)$  是細胞形狀因子;  $A_F$  是細胞中心到細胞膜的距離, 且方向與電場方向相同;  $E$  是外加電場強度(kV/cm)。其中  $f(A)$  的計算方式如下:

$$f(A) = \frac{2}{2 - A_1 A_2 A_3 \int_0^\infty \frac{1}{(s + s_F^2) \left( \sum_{n=1}^3 \sqrt{s + A_n^2} \right)}} \quad (2-2)$$

上述方程式中的  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$  是以細胞中心為基準到細胞膜的距離，即該細胞的長、寬、高。

當細胞為圓形其  $A_F$  較小，而形狀呈現橢圓形或是長桿狀時其  $A_F$  較大，當  $A_F$  數值較高時，需要較大的臨界電壓才能在細胞膜上產生孔洞，且細胞體積愈大也會造成  $A_F$  數值提高。除此之外，微生物細胞壁組成亦會影響臨界電壓數值，其中革蘭氏陽性菌細胞壁為單層但較厚實(15 ~ 80 nm); 格蘭氏陰性菌細胞壁為三層但較薄(10 ~ 15 nm)，因此格蘭氏陽性菌的細胞壁要產生孔洞時所需臨界電場會比格蘭氏陰性菌高。以圖四為例，*Saccharomyces cerevisiae* 為酵母菌，體積較大，所需臨界電場較低(4 kV/cm); *Listeria innocua* 為格蘭氏陽性菌且體積最小，所以需要較高的臨界電場強度(15 kV/cm); *Escherichia coli* 為格蘭氏陰性菌，體積中等，所需臨界電場強度為 12.5 kV/cm。



在本實驗中所使用的病原菌為大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌其生理特性可參見表五，體積大小為仙人掌桿菌最大，大腸桿菌次之，金黃葡萄球菌最小。雖然仙人掌桿菌為格蘭氏陽性菌，但其體積相較於其他兩種病原菌要大得多，因此以 PEF 殺菌過程中所需臨界強度最小，大腸桿菌次之，而金黃葡萄球菌除了是格蘭氏陽性菌外，其體積也是這三種病原菌中最小的，所以在 PEF 處理過程中需要最大的臨界電場強度，見表四 (A)、(B)、(C)。

表四、脈衝寬度對大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌臨界電場強度之影響。

Table 4. The effect of pulse wave width on critical electric fields of inactivating *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*.

(A) *Escherichia coli*

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	<i>E.coli</i>		
	$b_E$ (cm / kV)	$E_c$ (kV / cm)	$R^2$
3	0.6862	10.2616	0.72
6	1.3349	9.0188	0.97
9	1.4242	6.8902	0.99
12	2.5253	7.1145	0.99

註: *E.coli* 經系列稀釋  $10^3$  倍後，起始菌數約為  $10^6$  CFU/ml

(B) *Staphylococcus aureus*

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	<i>S.aureus</i>		
	$b_E$ (cm / kV)	$E_c$ (kV / cm)	$R^2$
3	0.0780	11.1208	0.80
6	1.6775	9.2233	0.87
9	2.3015	8.3417	0.87

註: *S. aureus* 經系列稀釋  $10^3$  倍後，起始菌數約為  $10^6$  CFU/ml

(C) *Bacillus cereu*

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	<i>B.cereus</i>		
	$b_E$ (cm / kV)	$E_c$ (kV / cm)	$R^2$
3	0.6644	7.9317	0.99
6	1.4781	7.9225	0.74
9	2.2373	7.0251	0.91
12	2.4194	5.4529	0.99

註: *B. cereus* 經系列稀釋  $10^3$  倍後，起始菌數約為  $10^5$  CFU/ml

表四、病原菌的特性概要。

Table 4. General characteristics of pathogenic microorganisms.

Characteristics	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Shape	Rod	Spherical	Rod
Diameter (µm)	0.9 ~ 1.5	0.5 ~ 1.0	1.0 ~ 2.0
Length(µm)	2.0 ~ 6.0	–	3.0 ~ 5.0
Type	Gram-negative	Gram-positive	Gram-positive
Temperature <sup>1</sup> (°C)	7 ~ 46(37*)	7 ~ 48(37*)	4 ~ 55(35*)
Oxygen conditions	Aerobic or facultatively anaerobic	Aerobic or facultatively anaerobic	Aerobic or facultatively anaerobic
pH <sup>2</sup>	4.0 ~ 9.0(7.0*)	4.2 ~ 9.5(7.0*)	4.3 ~ 9.3(7.0*)
Spore-forming	Not	Not	Yes

<sup>1</sup>Growth temperature range.

<sup>2</sup>Growth pH range.

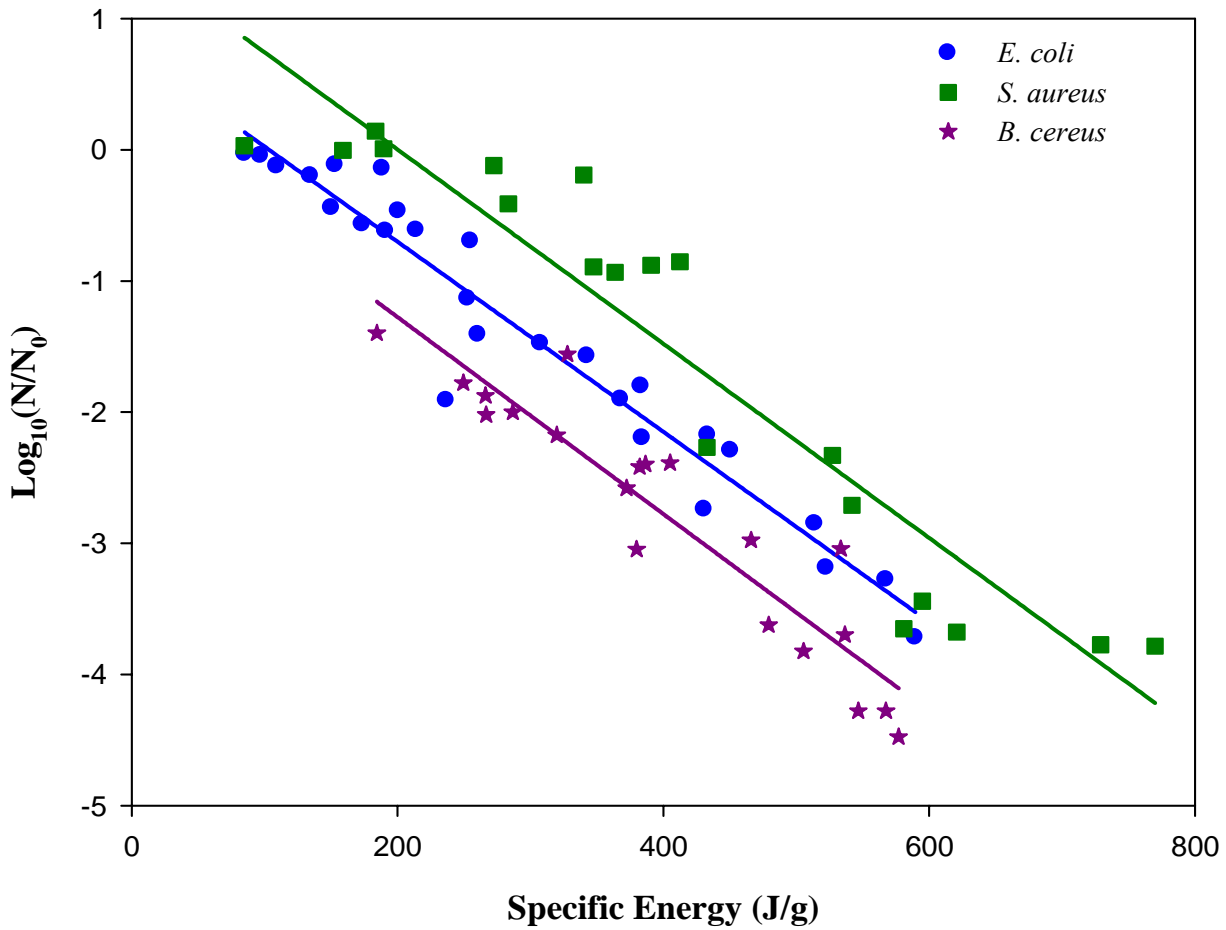
\*Optimum values of growth.

– :No reported.

(Jonathan *et al.*, 2008)

### (三) PEF 比能量與殺菌力之關係

透過方程式(3-3)、(3-4)可將不同脈衝寬度、電場強度殺菌效果彙整統一成比能量形式，由不同輸入能量大小評估 PEF 對三種微生物的殺菌效果，見圖十七。



圖十七、*E. coli*、*S. aureus*、*B. cereus* 經不同比能量之 PEF 處理對殺菌效率之影響。

Fig. 17 Influence of the specific energy on the inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* by PEF treatment.

經過線性回歸後可得到比能量對大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌的回歸方程式分別是(4-12)~(4-14)如下所述:

$$y = -0.0072x + 0.7486 \quad R^2 = 0.94 \quad (4-12)$$

$$y = -0.0074x + 1.4832 \quad R^2 = 0.89 \quad (4-13)$$

$$y = -0.0075x + 0.2257 \quad R^2 = 0.87 \quad (4-14)$$

由圖十七可知 PEF 處理過程中，輸入的能量愈大，對微生物的殺菌效果也愈好。有文獻指出，影響輸入能量大小取決於 PEF 的作用時間長短，且兩者為正相關，當作用時間愈長，相對的輸入能量也愈大(Jonathan *et al.*, 2007)。因此，在本實驗中採用不同脈衝寬度(3、6、9、12  $\mu$ s)所得之殺菌效果，皆以脈衝寬度為 12  $\mu$ s 者，殺菌效果最好，其中金黃葡萄球菌因電極槽承受力不足，脈衝寬度只有施以 9  $\mu$ s;大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌分別降低 3.72、3.77、4.48  $\log_{10}$  值，見表六、表七、表八。相對的，脈衝寬度愈寬，表示作用時間愈長，所以輸入的能量也相對增加，而達到最好的殺菌效果，且可搭配表四 (A)、(B)、(C)所列的臨界電場強度，針對不同種微生物初步設定殺菌所需參數。

此外，輸入能量較高時，在 PEF 處理過程會使溫度提高。有文獻指出，當溫度低於 30°C 時，細胞膜上帶有磷脂質的脂雙層呈膠體結構，此時細胞膜具有流動性，當溫度高於 30°C 時，脂雙層結構會變成液晶相(liquid-crystalline phase)，此時細胞膜厚度變薄、對外通透性增加且對電穿孔效應(electroporation)的敏感度變高，使細胞更容易被破壞、死亡(Aronsson & Rönner,2001; Heinz *et al.*, 2003)。

在本實驗中，起始溫度皆低於 30°C，但隨著電場強度、脈衝寬度增加，處理過程中溫度也明顯提高，但最高溫度不超過 61°C，且最高溫度通常出現在輸入能量最大之時，同時也是該微生物施以最大脈衝寬度處理，見表五、表六、表七。且最終溫度較傳統殺菌溫度低(pasteurization: 63°C,30 min.)，再加上本實驗的操作時間只有 3 秒，因此操作過程中產生的溫度不至於影響到 PEF 整體殺菌效果。

表六、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對大腸桿菌殺菌效果及處理後溫度之影響。

Table 6. The effect of the pulse waves, electric fields, intensity of current, and specific energy on the inactivation of *Escherichia coli* and treated temperature increment.

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)	$\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{N}_0)$	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
3	9.50	0.83	85.16	-0.03	28.2
	10.00	0.9	97.20	-0.05	30.8
	11.00	0.92	109.30	-0.13	32
	12.00	1.04	134.78	-0.20	35.7
	12.88	1.25	173.81	-0.57	38.4
	13.63	1.3	191.30	-0.62	37.6
	14.63	1.5	236.93	-1.91	44.5
6	8.88	0.8	153.36	-0.12	33.3
	9.50	0.92	188.78	-0.14	31
	10.50	1.09	247.21	-0.64	44.8
	11.50	1.05	260.82	-1.41	42.6
	12.00	1.42	368.06	-1.90	50
	12.63	1.59	433.59	-2.18	49.7
	13.13	1.59	450.77	-2.29	49.6
9	7.38	0.63	150.54	-0.44	37.3
	7.88	0.84	214.33	-0.61	38.4
	8.88	0.88	253.04	-1.14	46.5
	9.50	1	307.80	-1.48	45.3
	10.50	1.13	384.43	-2.20	53.6
	11.50	1.38	514.19	-2.85	56.3
	12.00	1.46	567.65	-3.28	57.3
12	7.38	0.63	200.72	-0.47	35.6
	7.88	0.75	255.15	-0.70	40.1
	8.63	0.92	342.79	-1.57	46.8
	8.88	1	383.40	-1.80	48.1
	9.50	1.05	430.92	-2.74	52.2
	10.00	1.21	522.72	-3.19	52.6
	10.50	1.3	589.68	-3.72	60.3

表七、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電場強度( $\text{kV/cm}$ )、電流(A)及比能量( $\text{J/g}$ )的 PEF 對金黃葡萄球菌殺菌效果及處理後溫度之影響。

Table 7. The effect of the pulse waves, electric fields, intensity of current, and specific energy on the inactivation of *Staphylococcus aureus* and treated temperature increment.

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Electrical fields ( $\text{kV/cm}$ )	Intensity of current (A)	Specific energy ( $\text{J/g}$ )	$\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{N}_0)$	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
3	9.25	0.85	84.92	0.03	30.80
	11.50	1.28	158.98	-0.01	33.40
	13.00	1.35	189.54	0.01	37.30
	14.50	1.74	272.48	-0.12	41.10
	15.75	2.00	340.20	-0.19	44.00
6	8.25	1.03	183.55	0.14	33.75
	10.50	1.25	283.50	-0.41	43.5
	11.75	1.54	390.85	-0.88	45.50
	12.00	1.67	432.86	-2.27	49.7
	13.00	1.93	541.94	-2.71	53.90
	13.50	2.04	594.86	-3.44	56.00
	13.75	2.09	620.73	-3.68	57.30
9	9.13	1.23	363.65	-0.94	44.50
	9.50	1.34	412.45	-0.85	47.2
	9.75	1.10	347.49	-0.89	43.80
	10.50	1.55	527.31	-2.33	50.2
	11.00	1.63	580.93	-3.65	55.60
	12.25	1.94	769.99	-3.79	60.30
	12.50	1.80	729.00	-3.77	60.90



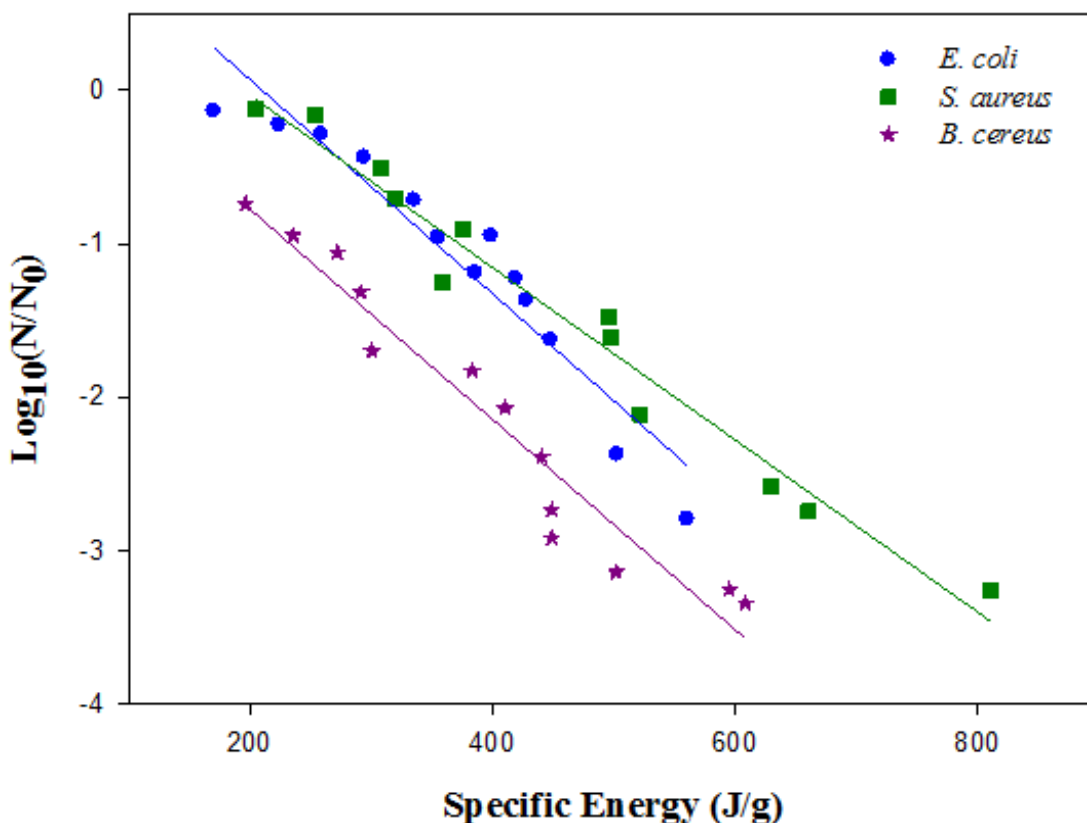
表八、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對仙人掌桿菌殺菌效果及處理後溫度之影響。

Table 8. The effect of the pulse waves, electric fields, intensity of current, and specific energy on the inactivation of *Bacillus cereus* and treated temperature increment.

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)	$\text{Log}_{10}(N/N_0)$	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
3	12.75	1.34	184.52	-1.40	36.50
	14.00	1.65	249.48	-1.78	38.70
	14.50	1.70	266.22	-1.88	41.20
	15.00	1.77	286.74	-2.00	41.50
	15.50	1.91	319.73	-2.18	43.00
	16.13	2.22	386.61	-2.40	44.50
	6	10.38	1.19	266.68	-2.02
11.00		1.38	327.89	-1.56	42.00
11.88		1.49	382.19	-2.42	45.30
12.50		1.50	405.00	-2.39	47.00
12.75		1.74	479.20	-3.62	50.80
13.50		1.84	536.54	-3.70	54.00
9		9.50	1.21	372.44	-2.58
	10.50	1.37	466.07	-2.98	48.40
	11.25	1.50	546.75	-4.28	53.60
	11.38	1.54	567.57	-4.28	54.40
12	8.38	1.05	379.89	-3.05	47.50
	8.50	1.12	411.26	-3.18	49.80
	9.00	1.30	505.44	-3.82	54.60
	9.75	1.37	577.04	-4.48	56.10

#### (四) 探討比能量公式的適用性以及預測 PEF 殺菌效果的準確性

由於儀器問題，無法固定在相同電場強度做重複殺菌實驗，因此圖十七中三種病原菌的回歸方程式包含了電場強度、脈衝寬度兩種影響因子，使得圖十七中的回歸方程式誤差值較大，無法準確預測 PEF 的殺菌效果。因此後續測試 PEF 殺菌的再現性，所輸入的能量則參考圖十七，將脈衝寬度固定在  $6\ \mu\text{s}$  並利用方程式(3-3)、(3-4)，評估相同輸入能量所需電場強度，再以相同操作步驟進行實驗，結果見圖十八。



圖十八、*E. coli*、*S. aureus*、*B. cereus* 在固定  $6\ \mu\text{s}$  脈衝寬度下，不同比能量 PEF 處理之效果。

Fig. 18 The effect of various specific energy of PEF with  $6\ \mu\text{s}$  pulse width on inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*.

經回歸分析後可得方程式(4-15)~(4-17)，分別是大腸桿菌、金黃葡萄球菌和仙人掌桿菌，如下所述：

$$y = -0.0070x + 1.4651 \quad R^2 = 0.91 \quad (4-15)$$

$$y = -0.0056x + 1.0897 \quad R^2 = 0.97 \quad (4-16)$$

$$y = -0.0068x + 0.5951 \quad R^2 = 0.94 \quad (4-17)$$

相較於未固定脈衝寬度者[方程式(4-12)~(4-14)]金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌脈衝寬度固定在 6  $\mu$ s 有較高的  $R^2$  值，且三種病菌的殺菌效果也比較符合預期，其中金黃葡萄球菌對 PEF 殺菌阻抗性最大，其次是大腸桿菌，PEF 對仙人掌桿菌殺菌效果最好。而且比較圖十七、圖十八可發現有相同的殺菌趨勢，因此，用來換算比能量的方程式(3-3)是適用於本套儀器中不同電擊參數的轉換，如電流、電壓、脈衝寬度。

之後利用回歸方程式(4-15)~(4-17)，個別輸入五種不同能量值，比較用回歸方程式預測以及實際操作兩者殺菌效果的差異性，結果見表九 (A)、(B)、(C)。雖然表九 (A)、(B)、(C)中顯示的預測值和實際值有些微差異，但因儀器問題無法固定能量操作二重複以上，因此參考文獻所述，將兩者再以線性回歸作圖 (Zhong *et al.*, 2005)。結果顯示此三種病原菌殺菌效果的預測值與實際值其  $R^2$  值皆在 0.95 以上；大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌  $R^2$  值分別是 0.9680、0.9557、0.9719，結果見圖十九、圖二十、圖二十一。由此顯示該菌種所得之回歸方程式是可以用來預測本套 PEF 於不同比能量的殺菌效果。

表九、固定脈衝寬度 6  $\mu$ s 的 PEF 處理大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌菌數殘存率預測值和實際值之比較。

Table 9. Comparison of the predictive survival values of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* derived from regression model with measurements.

(A) *Escherichia coli*

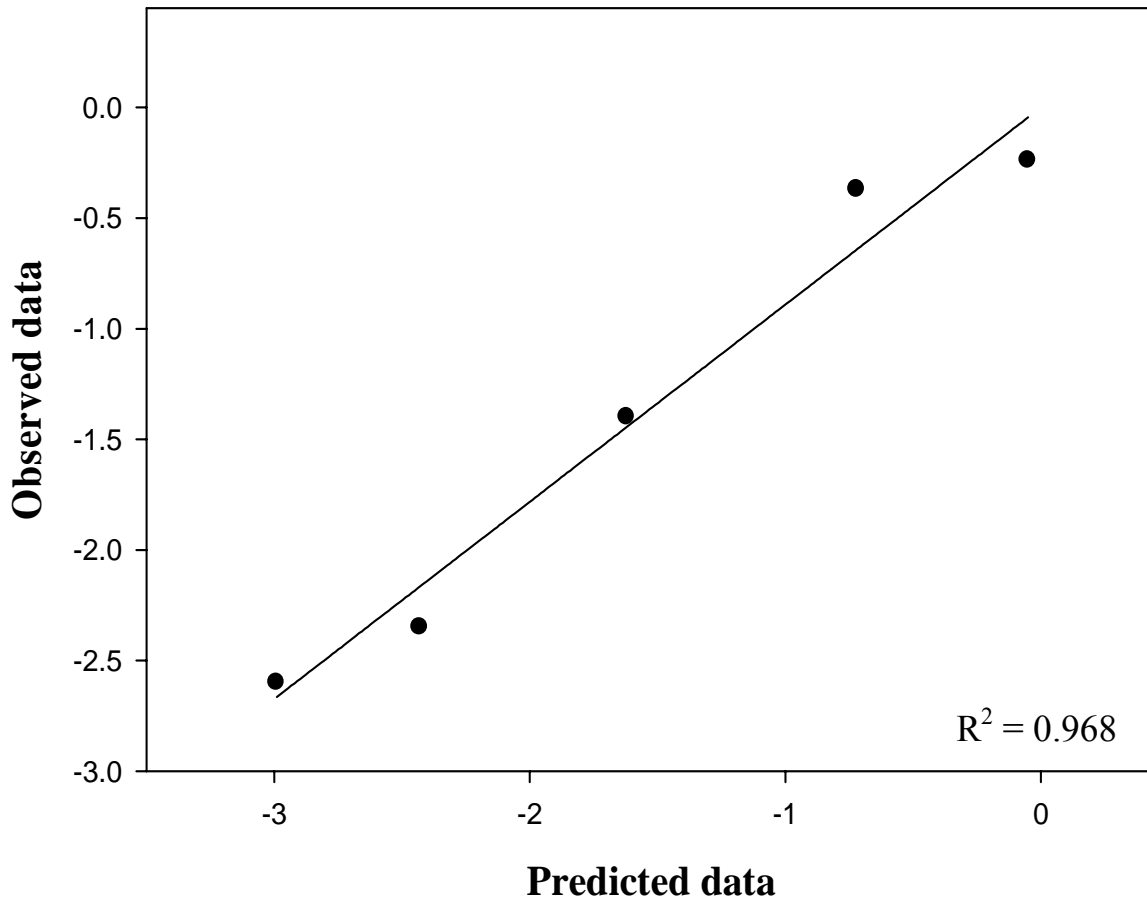
Specific energy (J/g)	Linear regression: $y = -0.007x + 1.4651$ $R^2 = 0.9126$	
	Prediction	Observation
216.37	-0.05	-0.24
312.20	-0.72	-0.37
440.64	-1.62	-1.40
557.05	-2.43	-2.35
635.73	-2.99	-2.60

(B) *Staphylococcus aureus*

Specific energy (J/g)	Linear regression: $y = -0.0056x + 1.0897$ $R^2 = 0.9683$	
	Prediction	Observation
232.24	-0.21	-0.04
303.02	-0.61	-0.38
430.40	-1.32	-0.76
589.80	-2.21	-2.24
693.37	-2.79	-2.37

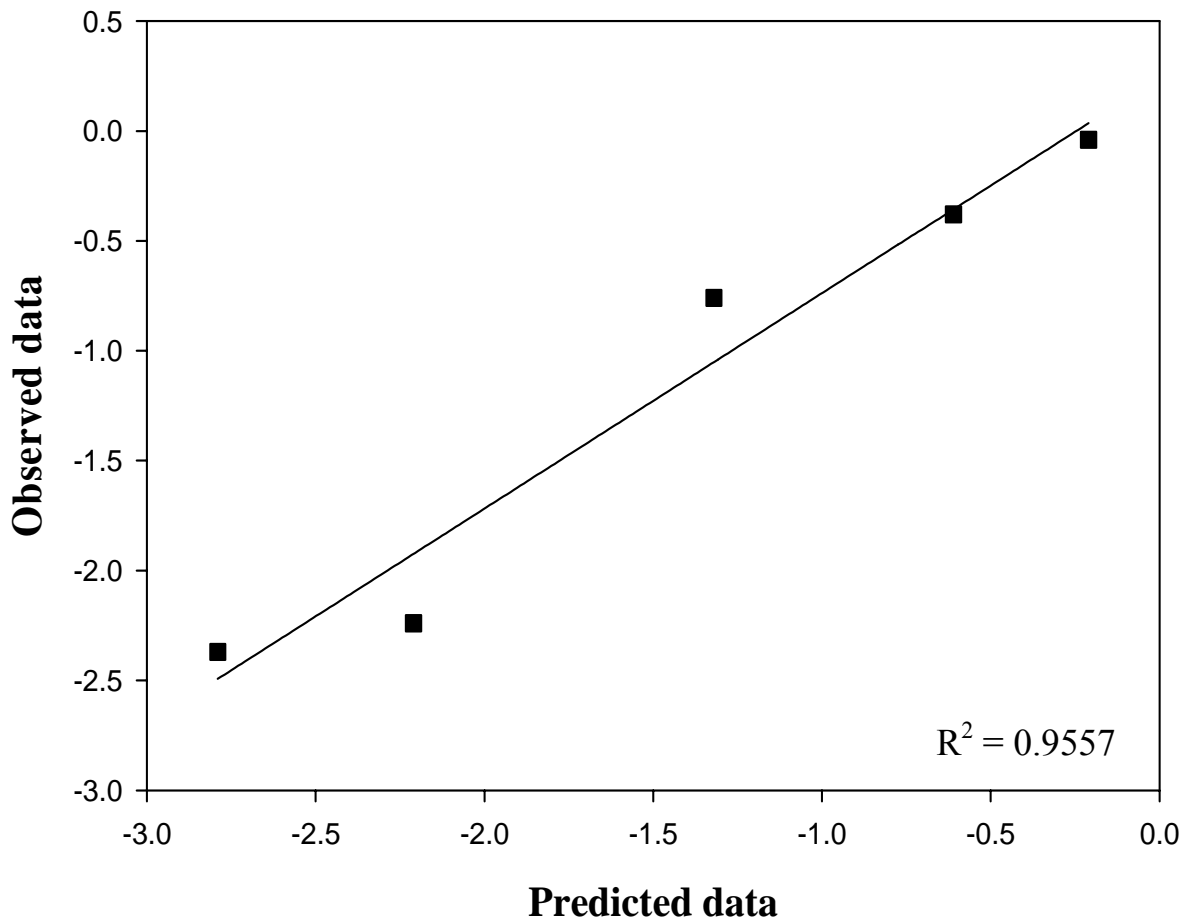
(C) *Bacillus cereus*

Specific energy (J/g)	Linear regression: $y = -0.0056x + 1.0897$ $R^2 = 0.9683$	
	Prediction	Observation
223.95	-0.93	-0.80
281.88	-1.32	-1.32
409.54	-2.19	-1.66
487.46	-2.72	-2.28
603.42	-3.51	-2.68



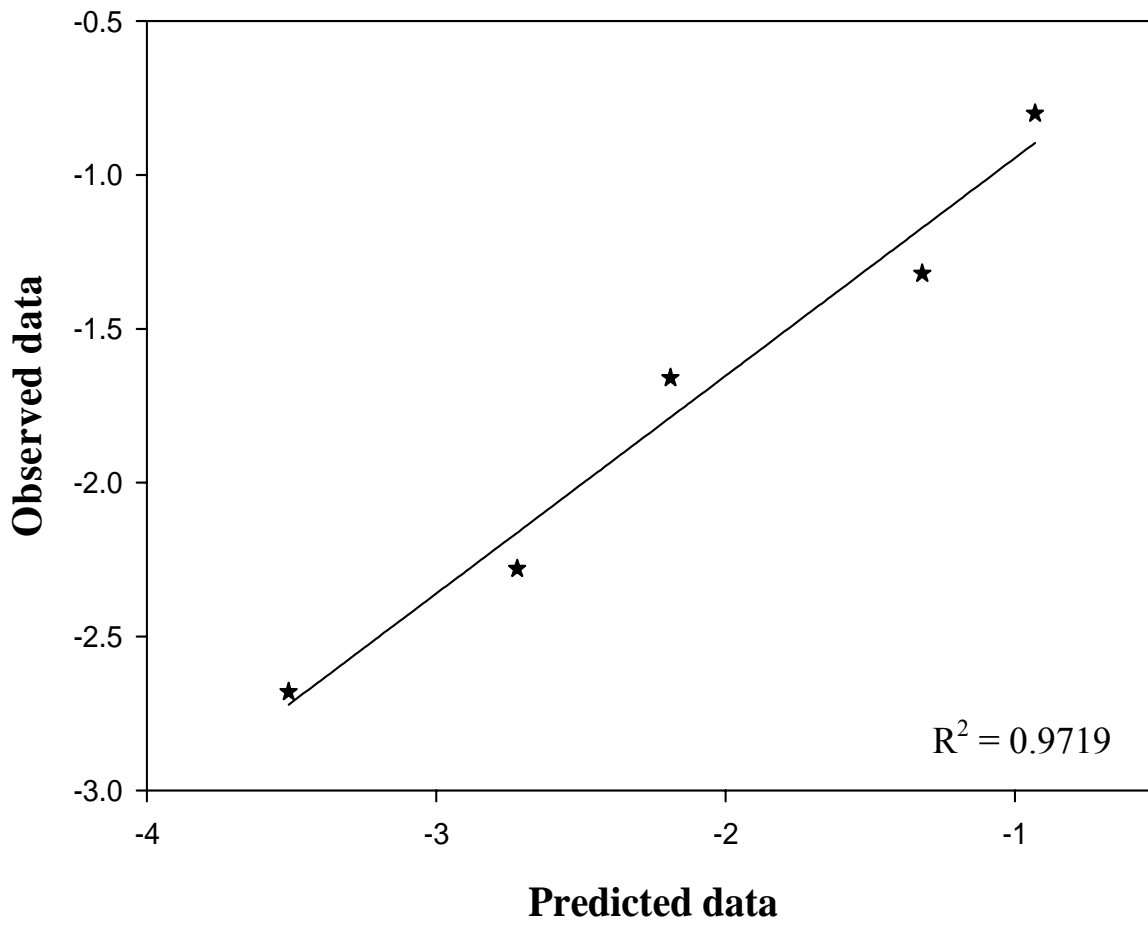
圖十九、PEF 處理的大腸桿菌殘存率預測值與實測值之相關性。

Fig. 19 The correlation between the predicted survival ratio of PEF treated *Escherichia coli* and measurements.



圖二十、PEF 處理的金黃葡萄球菌殘存率預測值與實測值之相關性。

Fig. 20 The correlation between the predicted survival ratio of PEF treated *Staphylococcus aureus* and measurements.



圖二十一、PEF 處理的仙人掌桿菌殘存率預測值與實測值之相關性。

Fig. 21 The correlation between the predicted survival ratio of PEF treated *Bacillus cereus* and measurements.

## 二、PEF 應用於諾麗果汁殺菌的探討

### (一) 諾麗果於控溫發酵下微生物生長情形

本實驗使用之諾麗果購自屏東縣珍果生技股份有限公司，將原料進行前處理後，置入密閉桶中於 25、35、45、55°C 搭配食品級脫氧包厭氣發酵 4 週，並於第 0、1、2、3、4 週取樣分析其微生物生長情形，並記錄不同發酵時間的優勢菌種，再以 16S rDNA 鑑定該微生物為何種菌種。

分析諾麗果在 25、35、45、55°C 厭氣發酵下，不同發酵時間的總生菌數、乳酸菌數、總真菌數、厭氧菌數變化情形。先將諾麗果肉攪拌均勻，未發酵前的諾麗果(第 0 週)各取 0.5 g，因為諾麗果未發酵前果汁產率極低，因此取果肉來塗抹；而第 1、2、3、4 週者則各取 1 ml 果汁，進行系列稀釋至適當倍數，再均勻塗抹至 PCA、PDA、MRS、FTMA 培養基上進行培養，每種培養皆作三重複，最後菌數單位以 CFU/ml 表示，其中 45、55°C 在四周發酵過程皆未長菌，而 25、35°C 厭氣發酵結果如圖二十二、圖二十三所示。

由圖二十二可發現，諾麗果發酵溫度固定在 25°C 時，總真菌數、總生菌數、乳酸菌數以及厭氧菌數會隨著發酵天數增加而顯著上升，且在第三週時有最高的菌數，分別是  $1.6 \times 10^7$ 、 $1.2 \times 10^7$ 、 $3.1 \times 10^7$ 、 $2.2 \times 10^7$  CFU/ml；在第 3 週之後所有菌數皆開始下降，但是菌數仍有  $10^5 \sim 10^6$  CFU/ml，超過生鮮果汁微生物含量的法定標準(總生菌數  $< 10^4$  CFU/ml)，因此在該溫度發酵之諾麗果汁經 4 週發酵後必須經過殺菌才能飲用或販售。

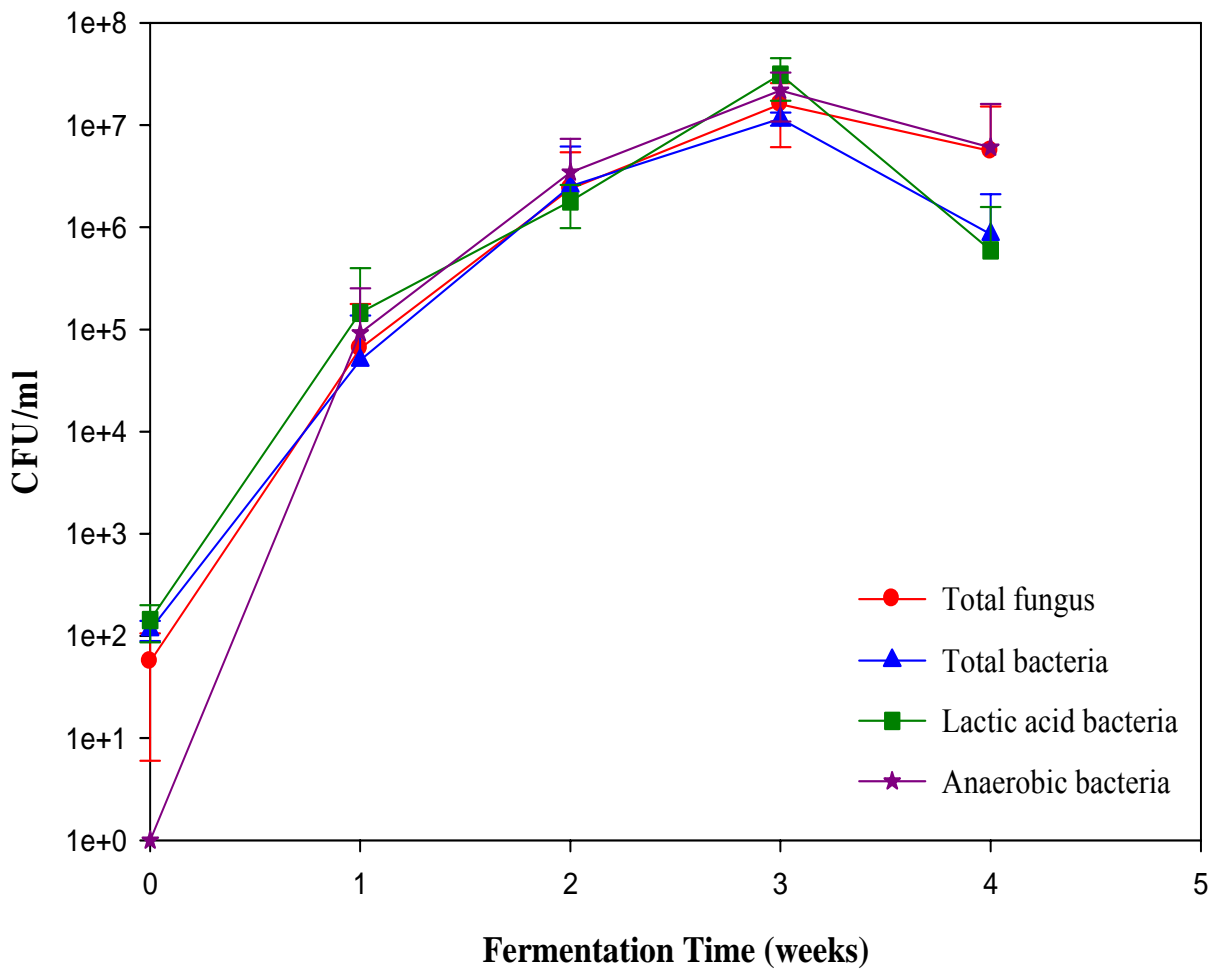


文獻顯示(施, 2009), 諾麗果汁在自然發酵期間, 其總生菌數和乳酸菌數在第 2 週即達到最高峰, 而總真菌數則在第 10 天就達到最大值, 其菌數分別為  $4.7 \times 10^5$  CFU/ml、 $1.07 \times 10^6$  CFU/ml 以及  $1.15 \times 10^6$  CFU/ml, 且菌數有 5 週的恆定期, 約維持在  $10^5$  CFU/ml 左右, 之後菌數才開始大幅下降至  $10^3$  CFU/ml; 相較於本實驗, 菌數在第三週達到最高峰後即開始下降, 推測可能原因有三: 其一, 菌數太多導致營養成分不足, 無法供應菌體生長所需; 其二, 菌體代謝的廢物累積達到閾值, 導致環境開始不利微生物生長; 其三, 諾麗果汁中化學成分改變, 根據文獻 (Yanine *et al.*, 2006), 諾麗果在發酵過程中會釋放酚類物質如: acubin、L-asperuloside、alizarin、scopoletin 及其他 anthraquinones 等, 會抑制微生物生長。

然而, 在本實驗中所得最高菌數為  $10^7$  CFU/ml, 比歷年文獻要來的高, 分別是  $2.3 \times 10^6$  以及  $4.7 \times 10^5$  CFU/ml (Limyati and junior, 1998; 施, 2009), 推測可能是果實品種及發酵環境不同而有所差異。由於本實驗的發酵週期較短, 因此無法了解第 4 週後微生物生長變化是否會如同文獻 (Yanine *et al.*, 2006; 施, 2009) 所述, 菌數降低至  $10^3$  CFU/ml 左右。

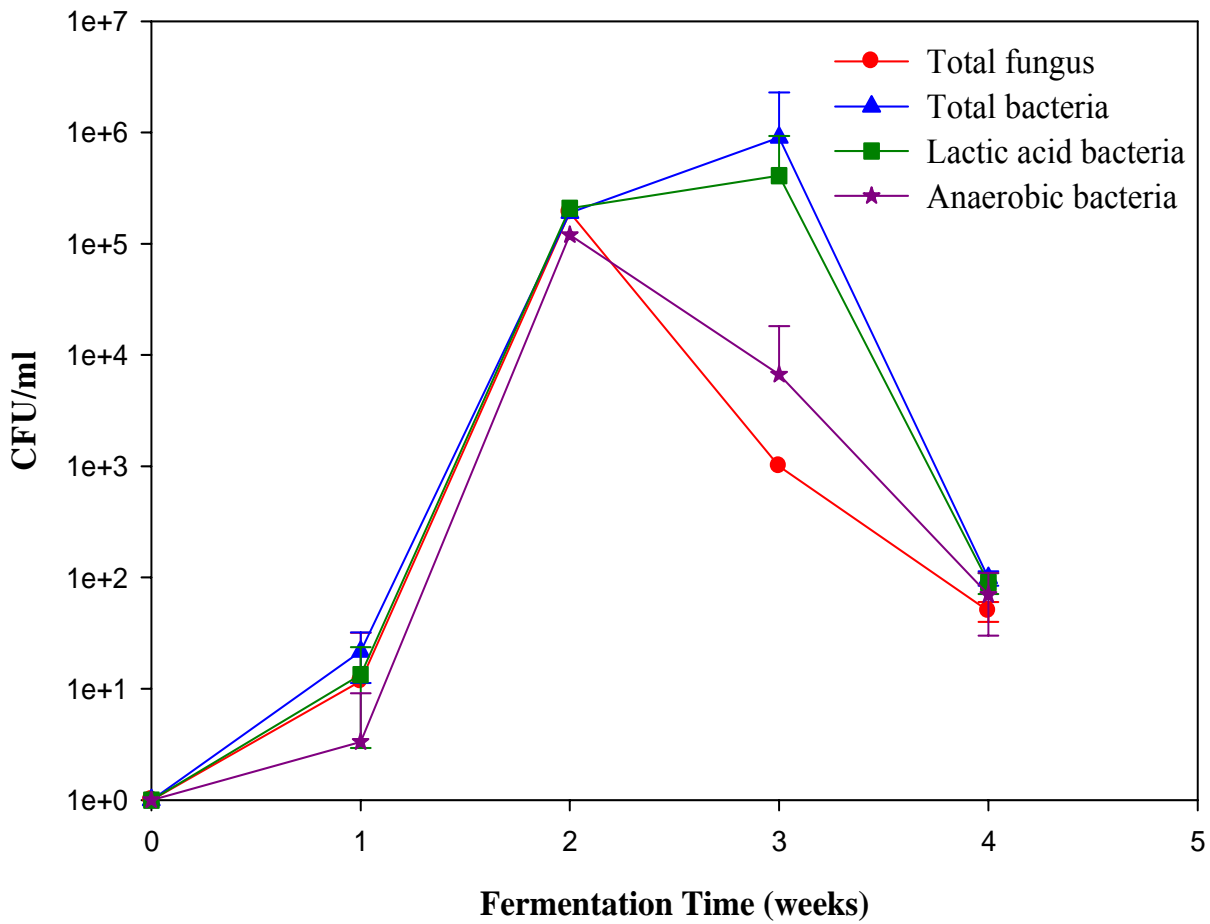
由圖二十三結果顯示, 諾麗果在  $35^\circ\text{C}$  發酵時, 在前 2 週所有的菌數皆明顯上升, 其中總真菌數、厭氧菌數達到最高峰, 分別是  $6.4 \times 10^4$ 、 $4.0 \times 10^4$  CFU/ml, 之後開始下降; 到第三週時, 總生菌數、乳酸菌數才達到最高峰, 分別是  $9.0 \times 10^5$ 、 $4.1 \times 10^5$  CFU/ml; 當發酵至第 4 週時, 所有菌種的菌數皆小於 100 CFU/ml, 低於鮮果汁中微生物含量的法定標準, 因此略做殺菌即可飲用販售。

相較於 25°C 發酵之微生物菌數，以 35°C 發酵可以略為抑制微生物生長，且到了第 2 週時，總生菌、乳酸菌還略微上升，可能是因為真菌及厭氧菌等微生物死亡，使得環境中的營養成分還足以提供其他微生物生長，到了第 3 週時，總真菌、厭氧菌開始大幅降低，推測原因可能是營養成分被利用完了，且菌種代謝物亦達到閾值所致；當然，也包含了諾麗果汁中的酚類化合物抑制微生物生長。在 25°C、35°C 下發酵至第 3 週，皆有相似的結果，但最終菌數則以 35°C 發酵者較低，因此在果汁產率和機能性成分沒有太大差異之下，可以採用 35°C 發酵 4 週，則可使用較低成本的殺菌模式處理，以節省成本。



圖二十二、諾麗果於 25°C 下，不同發酵期間總真菌數、總生菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之變化情形。

Fig.22 Changes of total fungus, total bacteria, lactic acid bacteria, anaerobic bacteria counts in noni fruit during fermentation at 25°C.



圖二十三、諾麗果於 35°C 下，不同發酵期間總真菌數、總生菌數、乳酸菌數、厭氧菌數之變化情形。

Fig. 23 Changes of total fungus, total bacteria, lactic acid bacteria, anaerobic bacteria counts in noni fruit during fermentation at 35°C.

(二) 發酵期間微生物菌種之鑑定

由不同溫度、發酵時期之 PCA、PDA、MRS 以及 FTMA 培養基中，挑選菌體顏色、形狀、大小等外觀差異之菌種，經鑑定後菌株的種類如表十。

表十、諾麗果汁發酵過程中的菌株。

Table 10. The isolated bacterial strains of fermented noni juice.

Time (weeks)	Room temperature	25°C	35°C
0	-	<i>Pantoea</i> spp. (PCB15) <i>Paenibacillus taichungensis</i> (PCB12) <i>Bacillus cereus</i> (MRB13) <i>Bacillus megaterium</i> (MRB11)	<i>Pantoea</i> spp. (PCB15) <i>Paenibacillus taichungensis</i> (PCB12)
1	<i>Paenibacillus macerans</i> (BW01) <i>Staphylococcus warneri</i> (BW21BNO)	<i>Bacillus cereus</i> (MR251a) <i>Bacillus megaterium</i> (MR2516) <i>Acetobacter</i> sp. (PD2516)	<i>Lysinibacillus</i> spp. (PC3513) <i>Curtobacterium</i> spp. (PC3511)
2	<i>Bacillus subtilis</i> (BW22a)	<i>Acetobacter</i> sp. (PD2522) <i>Gluconobacter japonicas</i> (MR2522)	<i>Bacillus subtilis</i> (MR3521) <i>Acetobacter orientalis</i> (PD3521)
3	<i>Bacillus cereus</i> (BW33a)	<i>Gluconobacter japonicus</i> (PC2533) <i>Staphylococcus aureus</i> (PC2531)	<i>Staphylococcus aureus</i> (PC3531)
4	<i>Bacillus megaterium</i> (BM01F1a) <i>Bacillus cereus</i> (BM01e) <i>Bacillus subtilis</i> (BM01F2) <i>Acetobacter orientalis</i> (BM01a) <i>Staphylococcus caprae</i> (BW241a) <i>Staphylococcus capitis</i> (BW241c)	<i>Acetobacter orientalis</i> (PC2541)	-

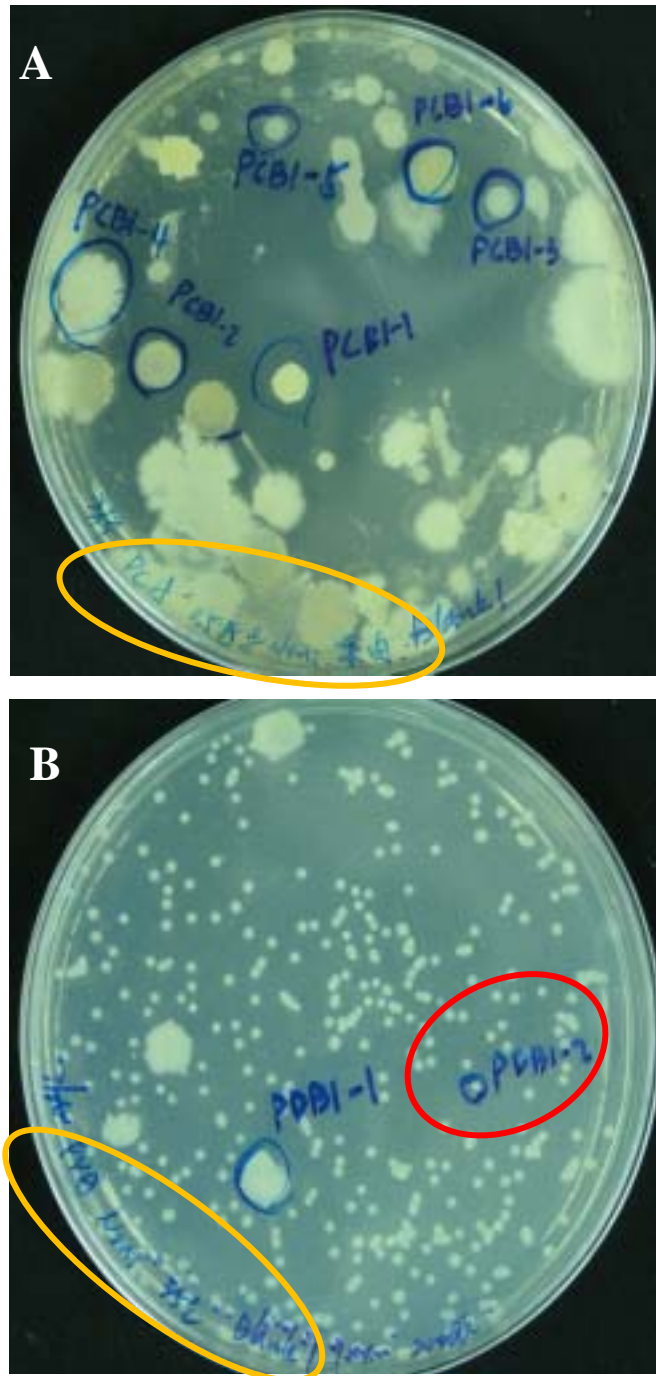
-: No detected the microorganisms.

新鮮的諾麗果汁塗抹於 PCA 中所得之微生物有 6 種，如圖二十四 (A)，分別是 PCB1-1、PCB1-2、PCB1-3、PCB1-4、PCB1-5 和 PCB1-6，其中 PCB1-2 是 *Paenibacillus* spp.，PCB1-3 和 PCB1-5 是 *Pantoea* spp.，PCB1-5 和 PCB1-6 為 *Bacillus* spp.，在整個培養基中並無明顯優勢菌。當諾麗果汁於 25°C 中發酵 1 週後，取其塗抹於 PDA 上可得到 6 種微生物，分別為 PD251-1、PD251-2、PD251-3、PD251-4、PD251-5 和 PD251-6，其中 PD251-2、PD251-3、PD251-4 是 *Gluconobacter* sp.，PD251-6 則是 *Acetobacter* sp.，PD251-2 為 PDA 培養基中所佔比例最多之菌種，見圖二十四 (B)。諾麗果汁於 25°C 中發酵至第 2、3 和 4 週後，個別取其果汁塗抹於 PDA、PCA、PCA 上，可分別得到 PD252-1、PD252-2 以及 PC253-1、PC253-1、PC253-3 和 PC254-1 等菌落，其中 PD252-1、PC253-3 為 *Gluconobacter* sp.，PD252-2 和 PD254-1 為 *Acetobacter* spp.，PC253-1 則是 *Staphylococcus* sp.。在培養基的菌相中以 PD252-1、PC253-3、PD252-2、PD254-1 佔較大的比例。由此可知，諾麗果汁於 25°C 中發酵時，隨著發酵時間增加，在果汁中醋酸菌屬會形成優勢菌群，見圖二十五(A)、(B)、(C)。

取諾麗果汁於 35°C 中發酵 1、2 和 3 週果汁，皆塗抹在 PCA 培養基上，可個別得到 PC351-1、PC351-2、PC351-3 以及 PC352-1 和 PC353-1 等菌落，其中 PC351-3 為 *Lysinibacillus* sp.，PC352-1 為 *Acetobacter* sp.，PC353-1 則是 *Staphylococcus* sp.。在培養基的菌相中以 PC352-1 佔較大的比例。由此可知，諾麗果汁於 35°C 中發酵至第 2 週時，醋酸菌會形成優勢菌群；但發酵至第 3 週時，

優勢菌群則轉為 *Staphylococcus* sp.，如圖二十六(A)、(B)、(C)。當發酵第 4 週時，其菌相與第 3 週相差無幾，因此未對培養基拍照及菌種鑑定。

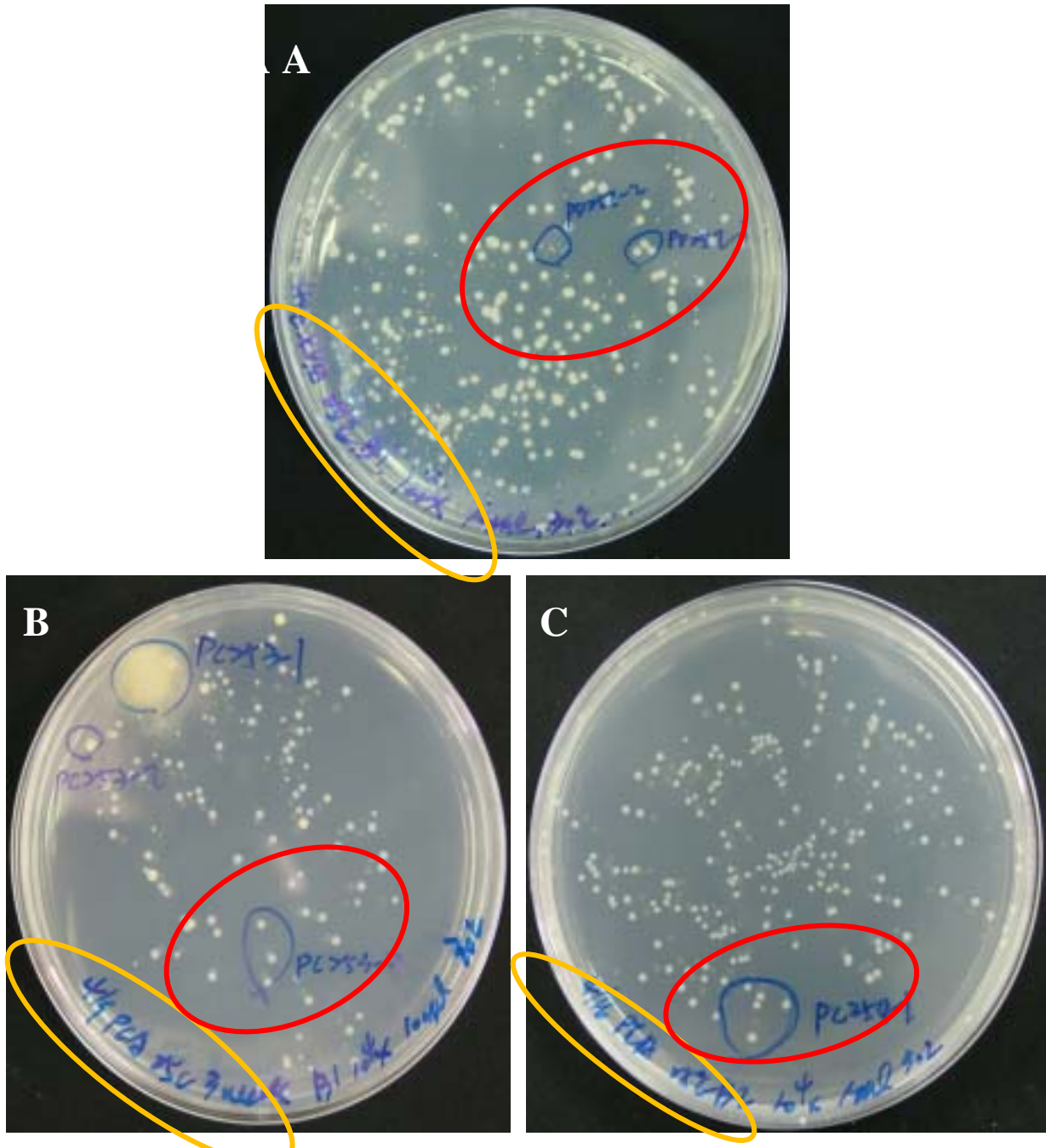
將廠商自行發酵之諾麗果汁塗抹於 MRS、PDA 上，可得到編號為 MR-1-A、MR-1-B、MR-1-C、MR-1-D 等微生物。其中 MR-1-A 為 *Rummeliibacillus* sp.; 而 MR-1-B、MR-1-D 為 *Acetobacter* spp.; MR-1-C 則是 *Bacillus* spp.，且在此培養基中是以 MR-1-B、MR-1-D 所佔比例最高，顯示廠商發酵之諾麗果汁亦是以醋酸菌屬為其優勢菌群，見圖二十七。



圖二十四、諾麗果新鮮果汁及於 25°C 發酵 1 週之果汁，分別塗抹於 PCA (A) 和 PDA (B) 中之微生物菌相。

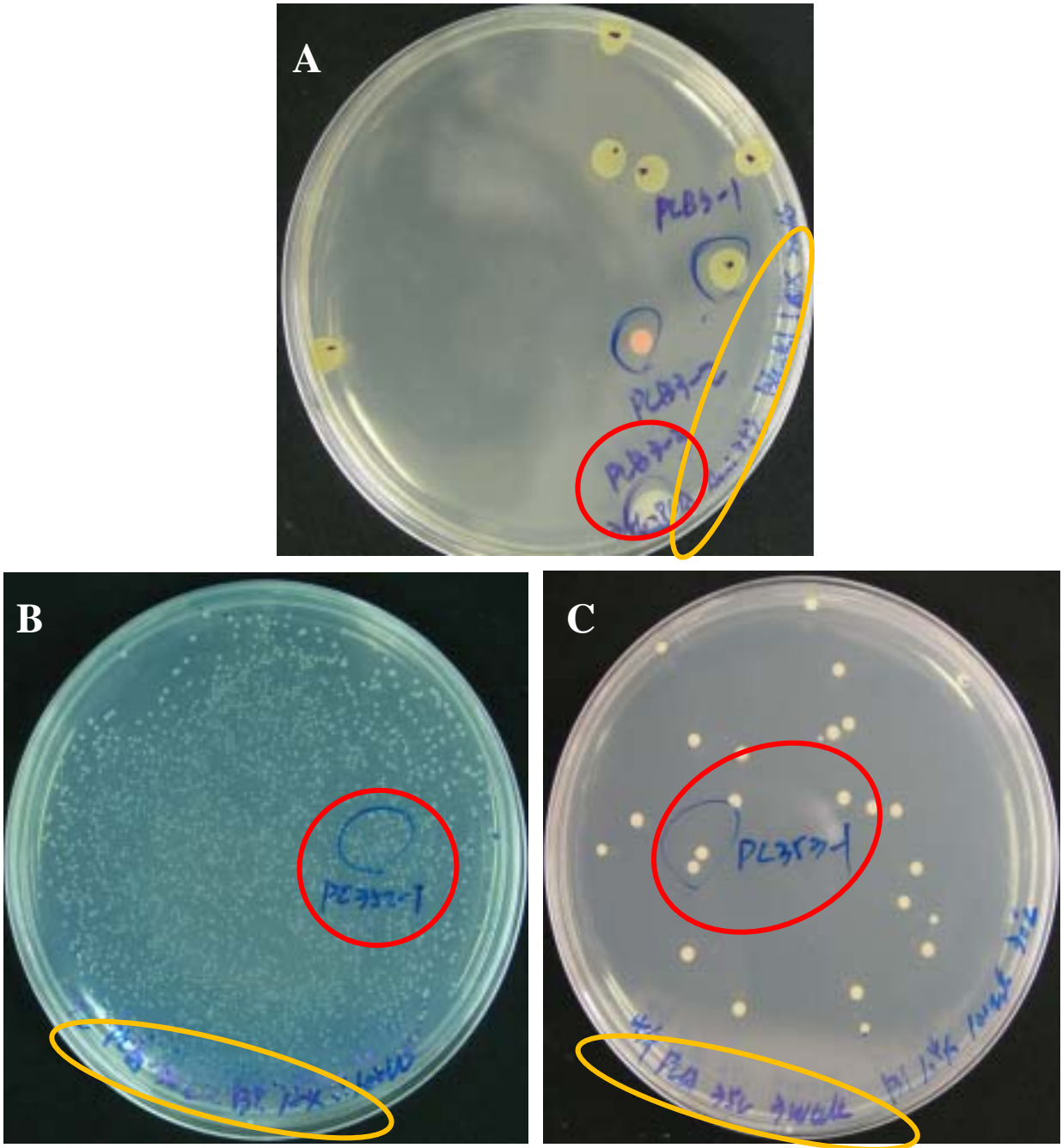
Fig. 24 The dominant species in PCA (A) and PDA (B) for fresh noni juice and one week fermentation noni juice at 25°C, respectively.





圖二十五、諾麗果於 25°C 發酵 2、3、4 週之果汁，分別塗抹於 PDA (A)、PCA (B) 和 PCA (C) 中之微生物菌相。

Fig. 25 The dominant species in PDA (A), PCA (B), and PCA (C) for two, three, and four weeks fermentation noni juice at 25°C, respectively.



圖二十六、諾麗果於 35°C 發酵 1、2、3 週之果汁，皆塗抹於 PCA 中，分別是(A)、(B)、(C)之微生物菌相。

Fig. 26 The dominant species in PCA (A), PCA (B), and PCA (C) for one, two, and three weeks fermentation noni juice at 35°C, respectively.



圖二十七、廠商發酵之諾麗果汁塗抹在 MRS 上之微生物菌相。

Fig. 27 The dominant species in MRS for fermentation noni juice by factory.

將這些挑選出來的菌種 經過多次純化後，可得到其單一菌落，高溫破壞其細胞壁，吸取其 DNA 並添加特定 primer 及 PCR 反應試劑，透過 PCR 反應器擴增我們所需片段，經過電泳圖確定 DNA 有達到所需長度(1.5 kb)後，見圖二十八，再送交明欣科技股份有限公司定序。



圖二十八、由諾麗果分離之微生物 DNA 的 PCR-16S rDNA 反應結果。

Fig. 28 The PCRprofile representing 16S rDNA of bacteria isolate from noni juice.

Lane 1: 1Kb DNA marker

Lane 2: BM06a

Lane 3: BM36d

之後將定序結果與 NCBI 網站上的資料庫作 Blast 比對，可得到該微生物之菌屬，之後再用 CLC Main Workbench 5.0 軟體搭配已確定菌種之序列來分析比對由諾麗果汁中分離之微生物為何種菌種，並以無權重群組算數平均法

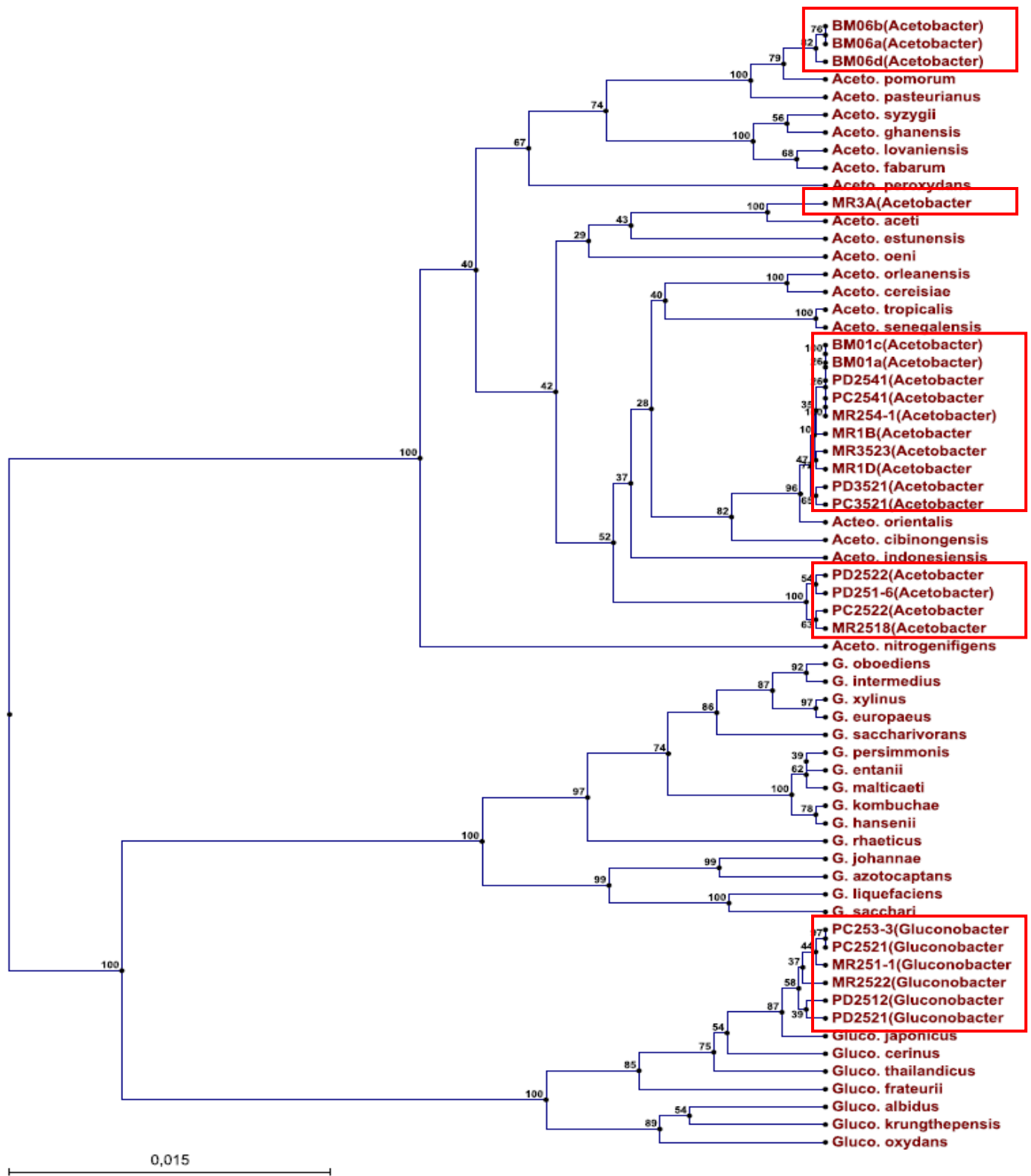
(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means, UPGMA) 繪製其演化樹，如圖二十九、圖三十、圖三十一、圖三十二、圖三十三，由這些演化樹圖可以判斷本實驗分離之菌種與已知菌種之間的親緣性，親緣性接近者則會被歸類在同一群(class)中，若有自成一類之菌種，可能原因有二，其一可能是有科學家已找到該菌種但尚未正式命名，其二有可能此菌是一株未被人類發現的菌種。

依照 UPGMA 的原理可知不同物種之間親緣性遠近，其區分出來的群組數字愈大，並依此細分下去，以區分同菌屬間不同菌種之差異。結果顯示在本實驗中所分離到的菌種有 *Acetobacter* spp.、*Bacillus* spp.、*Curtobacterium* spp.、*Gluconobacter* sp.、*Lysinibacillus* spp.、*Microbacterium testaceum*、*Paenibacillus* spp.、*Pantoea* spp.、*Rummeliibacillus* sp.、*Staphylococcus* spp.等。相較於廠商發酵之諾麗果汁中，兩者具有相同的菌屬，如：*Acetobacter* spp.、*Paenibacillus* spp.、*Bacillus* spp.以及 *Curtobacterium* spp.。

根據培養基上標記之比例最大之菌種，見圖二十四、圖二十五、圖二十六。結果顯示，在未發酵前的諾麗果汁並沒有優勢族群，然而在控溫發酵部分，從第 1 週至第 4 週的優勢菌種皆以醋酸菌屬為主，如：*Gluconobacter japonicus* (PD251-2)、*Gluconobacter japonicus* (PD252-1)、*Acetobacter* sp. (PD252-2)、

*Gluconobacter japonicus* (PC253-3)、*Acetobacter orientalis* (PC254-1);且在廠商自行發酵的諾麗果汁中，其優勢菌種亦是以醋酸菌屬為主，如；*Acetobacter orientalis* (MR-1-B、MR-1-D)，與本實驗結果相同，見圖二十七。由於醋酸菌屬在生長過程中會產生醋酸，使諾麗果汁 pH 值下降，不利於其他菌種生長，而形成優勢族群，此一結果與文獻相符(施，2009)。但是本實驗最初目的是要觀測厭氣發酵下的微生物變化，而醋酸菌屬是屬於好氧菌，推測原因可能是桶子內部遺留空間過大，導致脫氧包無法完全去除氧氣所致。

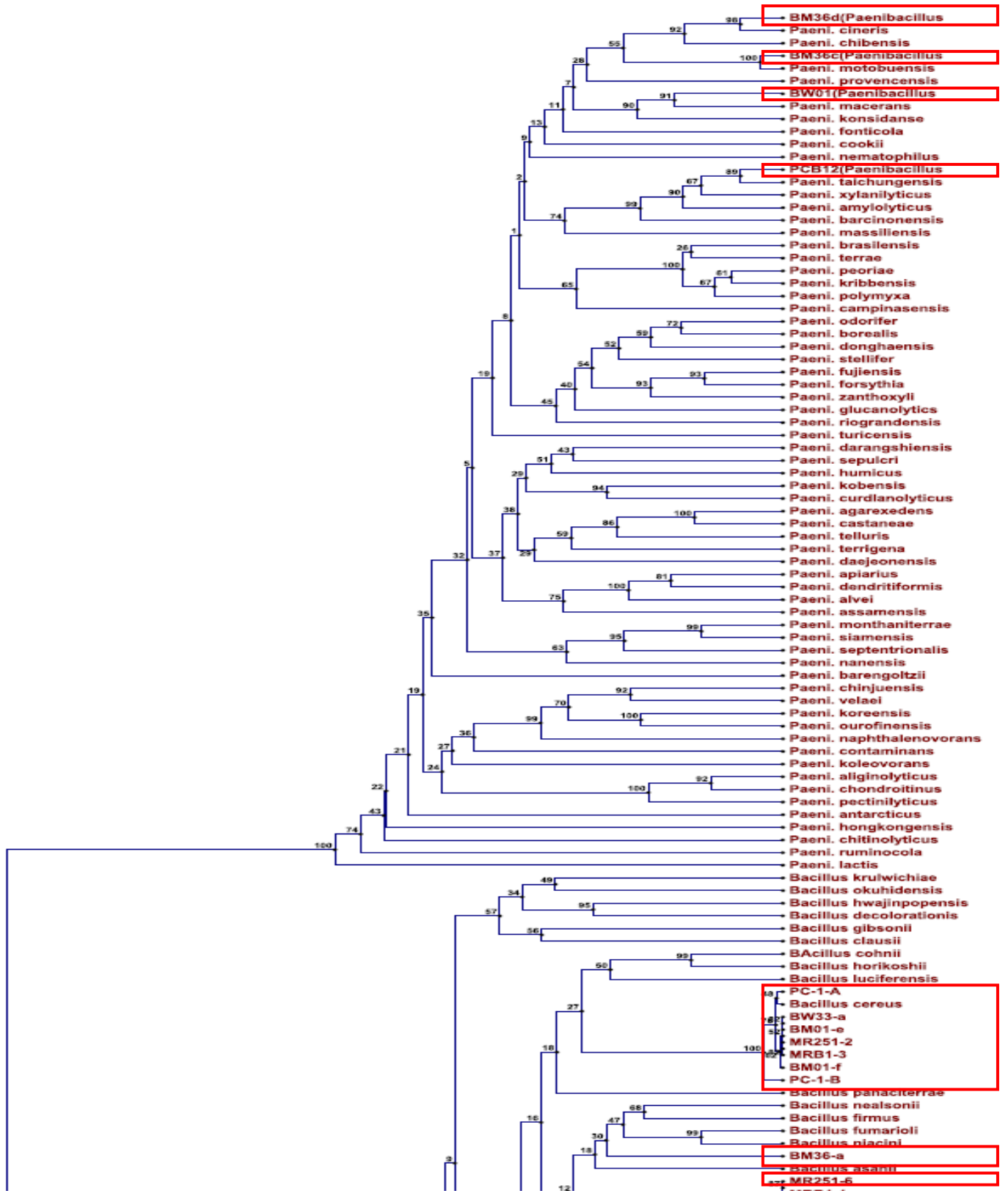
至於其他菌種，有的是植物性病原菌，或是在操作過程中易因人為汙染之菌種，其中會造成植物疾病的菌屬有 *Curtobacterium* spp.，會造成甜菜葉面上的黃斑、大豆種子萎縮等疾病(Hang *et al*, 2007);而 *Pantoea* spp.則有文獻指出可以抑制楊桃葉面上的病原菌(廖，2002); *Lysinibacillus xylanilyticus*、*Microbacterium testaceum* 以及 *Paenibacillus* spp.皆是由土壤中分離而得; *Bacillus* spp.亦廣泛存在於土壤之中，推斷是因為諾麗果表面孔隙未清洗乾淨而殘留些許泥土中含有這些微生物所致;至於 *Staphylococcus* spp.則可能是在操作過程中人為汙染，如 *Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis* 皆是常附著於人體皮膚上之微生物。而些菌種到了發酵後期，皆會因為諾麗果汁 pH 值過低(< 3.61)而被抑制，以致無法產生太多毒素，傷害人體。



圖二十九、由諾麗果分離之醋酸菌屬演化樹狀圖。

Fig. 29 The evolutionary tree of *Acetobacter* spp. and *Gluconobacter* sp. from noni juice.

註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。

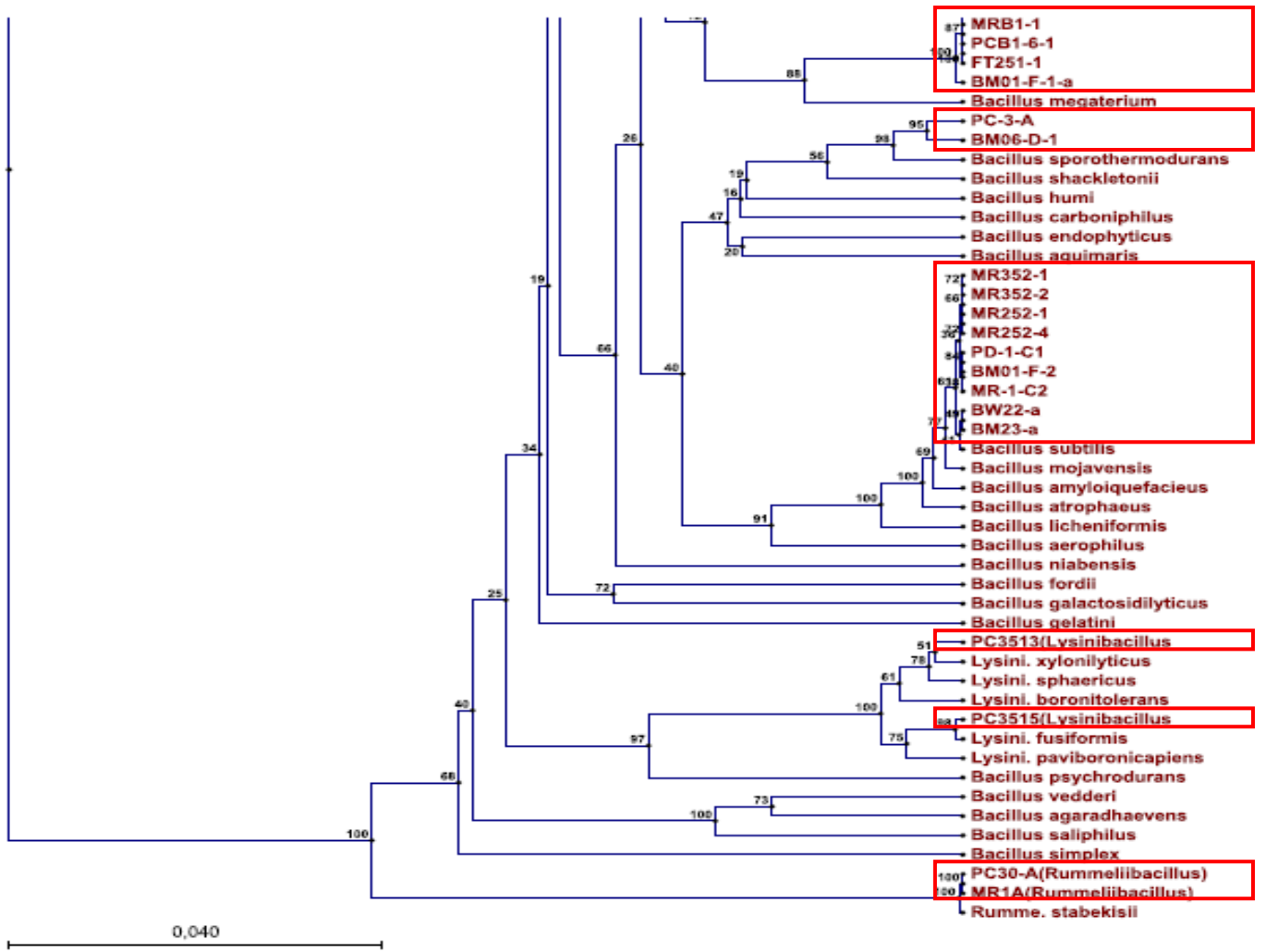


圖三十、由諾麗果分離之桿菌菌屬演化樹狀圖。

Fig. 30 The evolutionary tree of *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., and *Rummeliibacillus* sp. from noni juice.

註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。

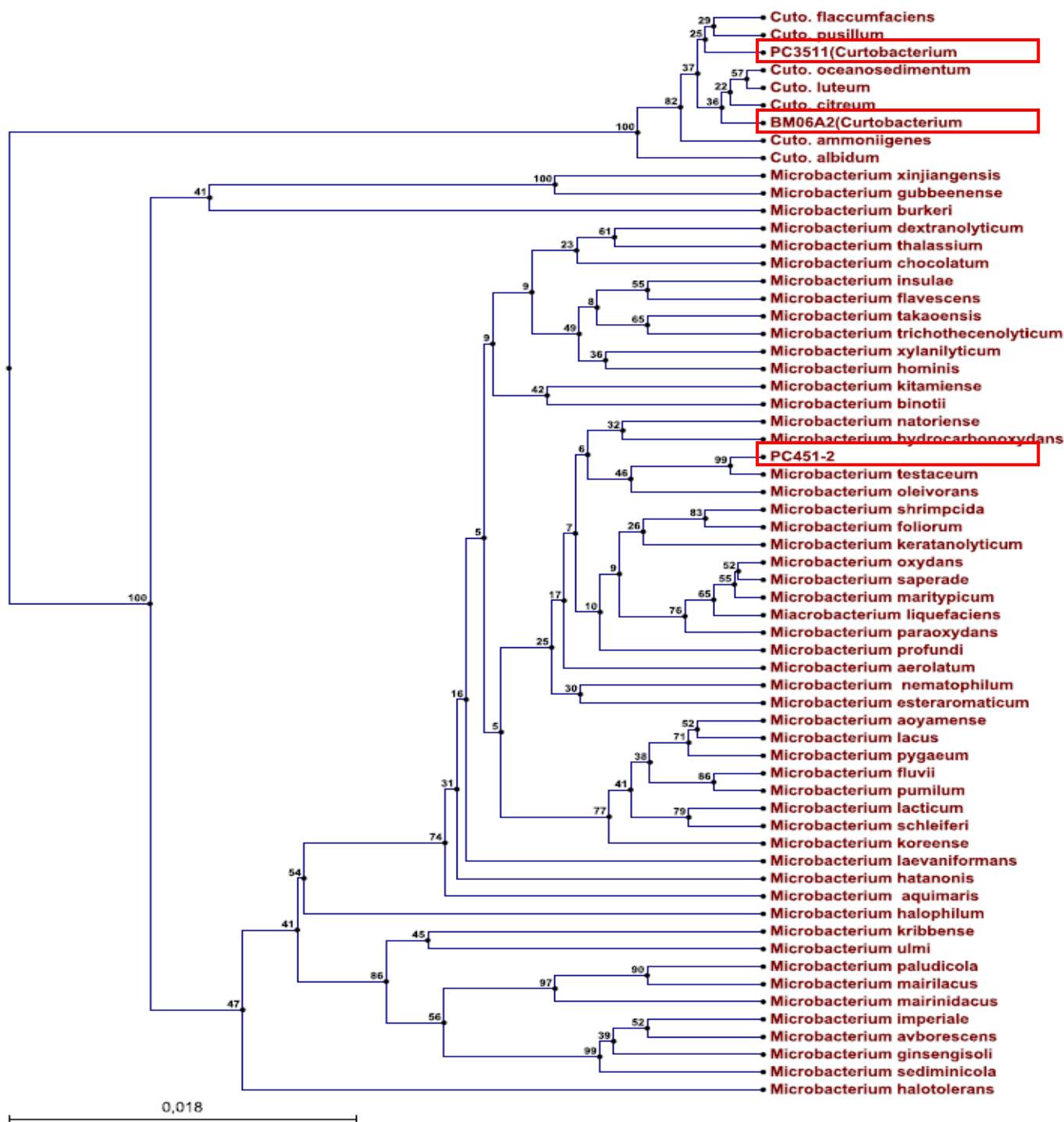




圖三十、由諾麗果分離之桿菌菌屬演化樹狀圖。(續)

Fig. 30 The evolutionary tree of *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., and *Rummeliibacillus* sp. from noni juice. (Continued)

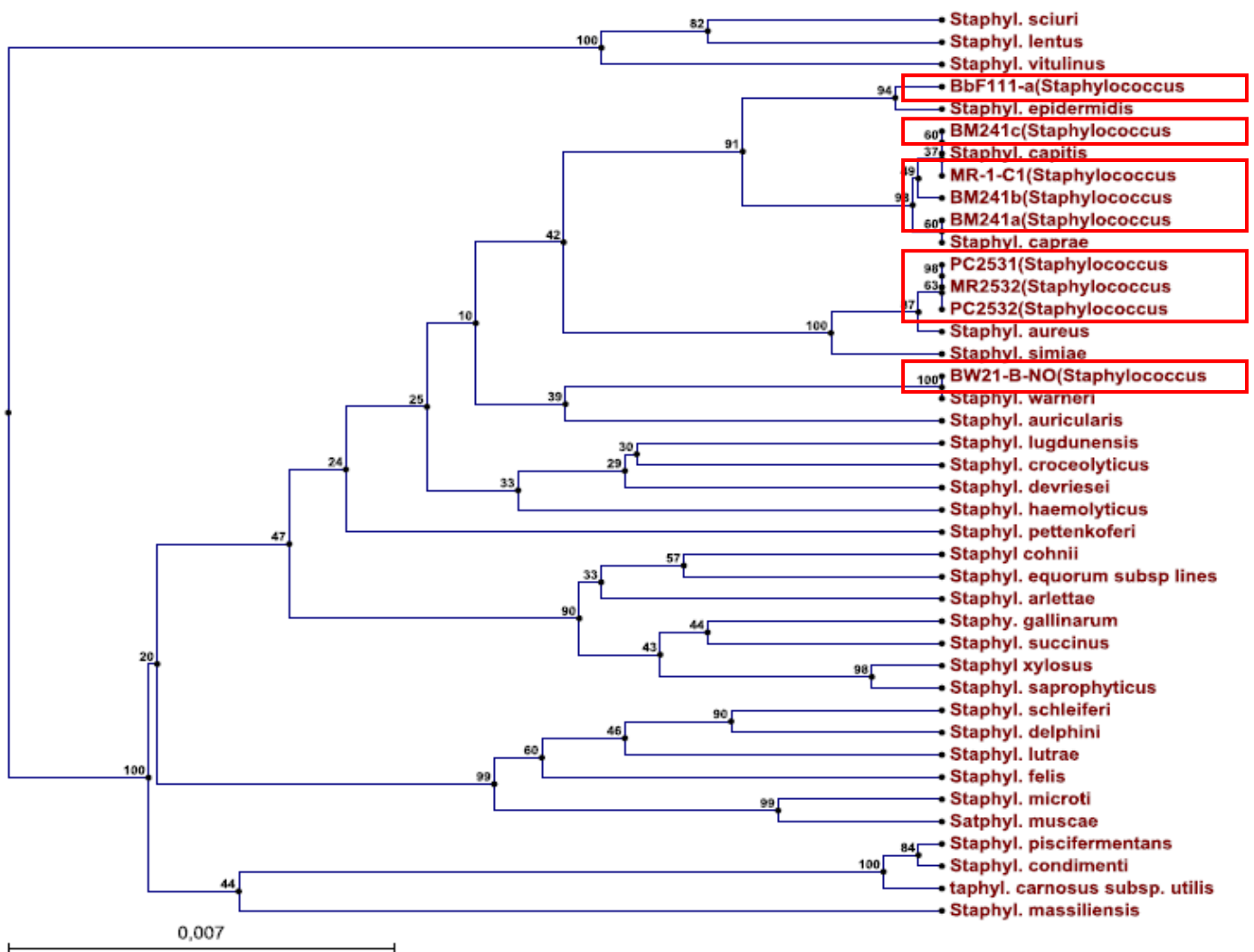
註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。



圖三十一、由諾麗果分離之微球菌菌屬演化樹狀圖。

Fig.31 The evolutionary tree of *Cutobacterium* spp. and *Microbacterium* sp. from noni juice.

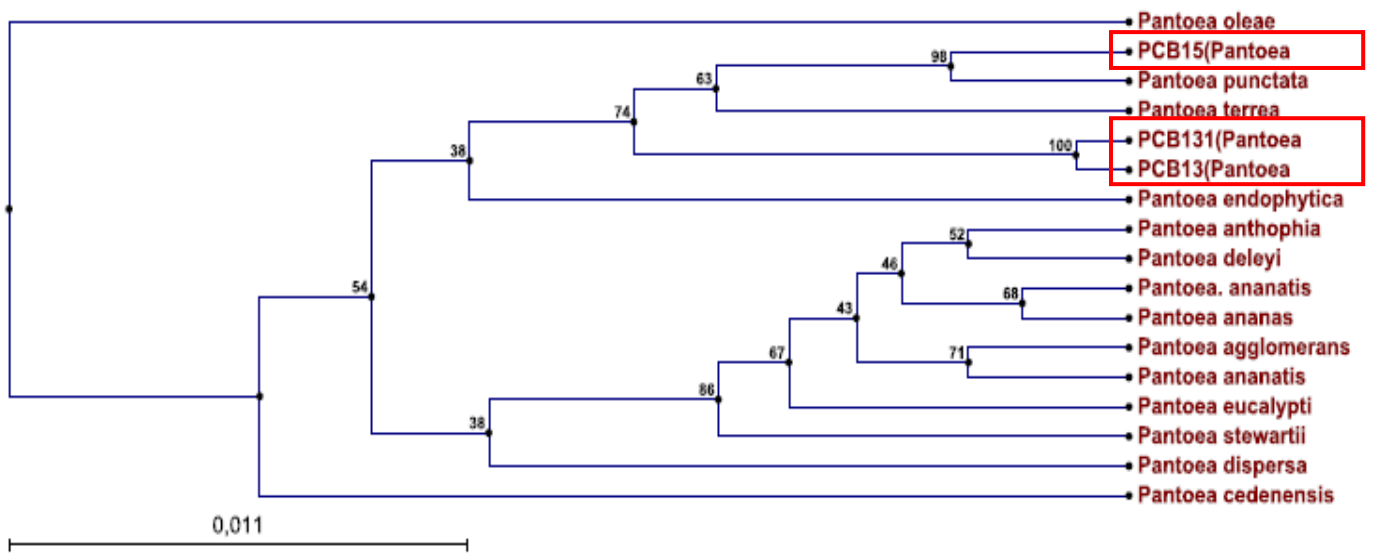
註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。



圖三十二、由諾麗果分離之球菌菌屬演化樹狀圖。

Fig. 32 The evolutionary tree of *Staphylococcus* spp. from noni juice.

註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。



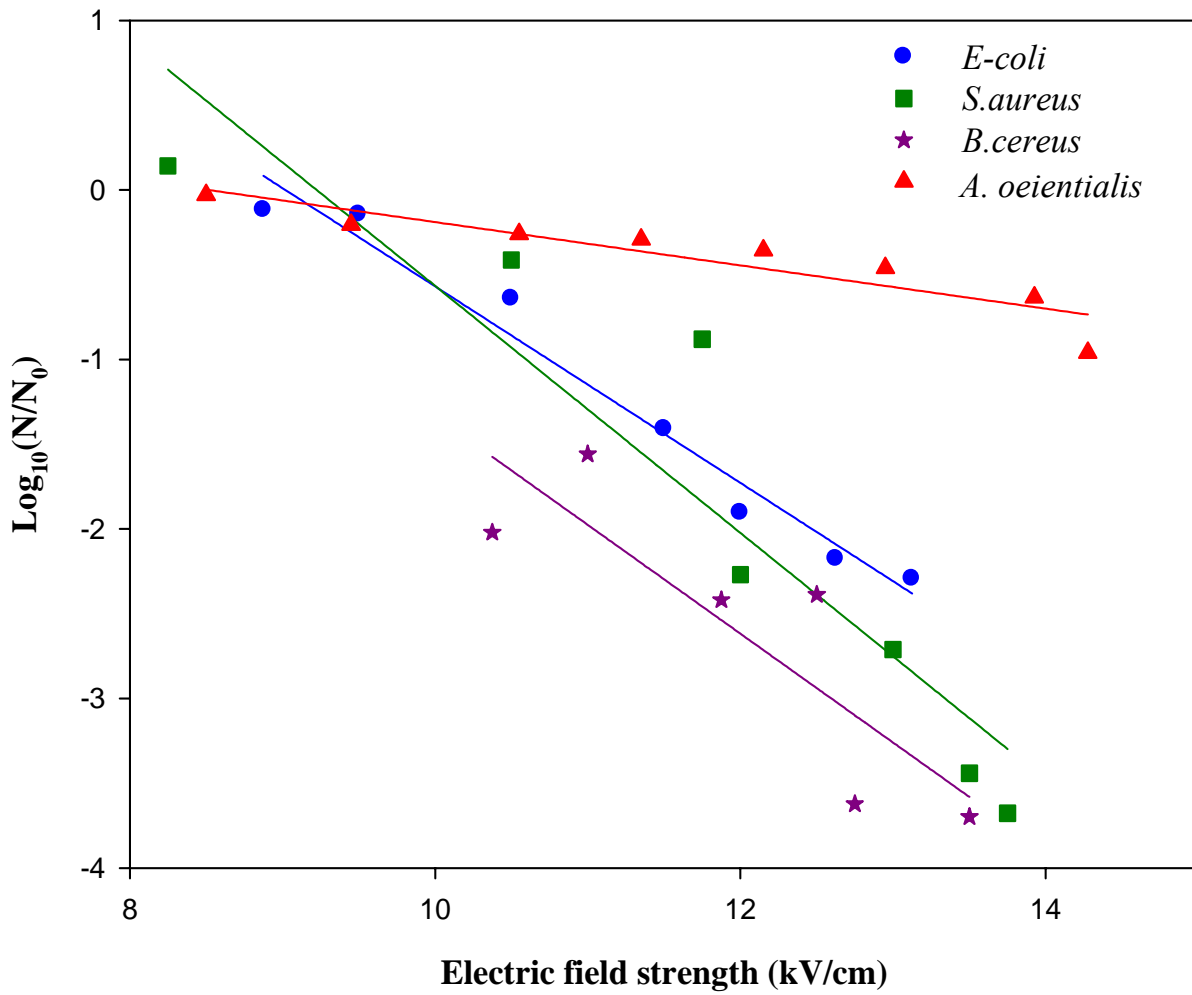
圖三十三、由諾麗果分離之泛菌菌屬演化樹狀圖。

Fig. 33 The evolutionary tree of *Pantoea* spp. from noni juice.

註:以紅色框框住者，為本實驗分離之菌種。

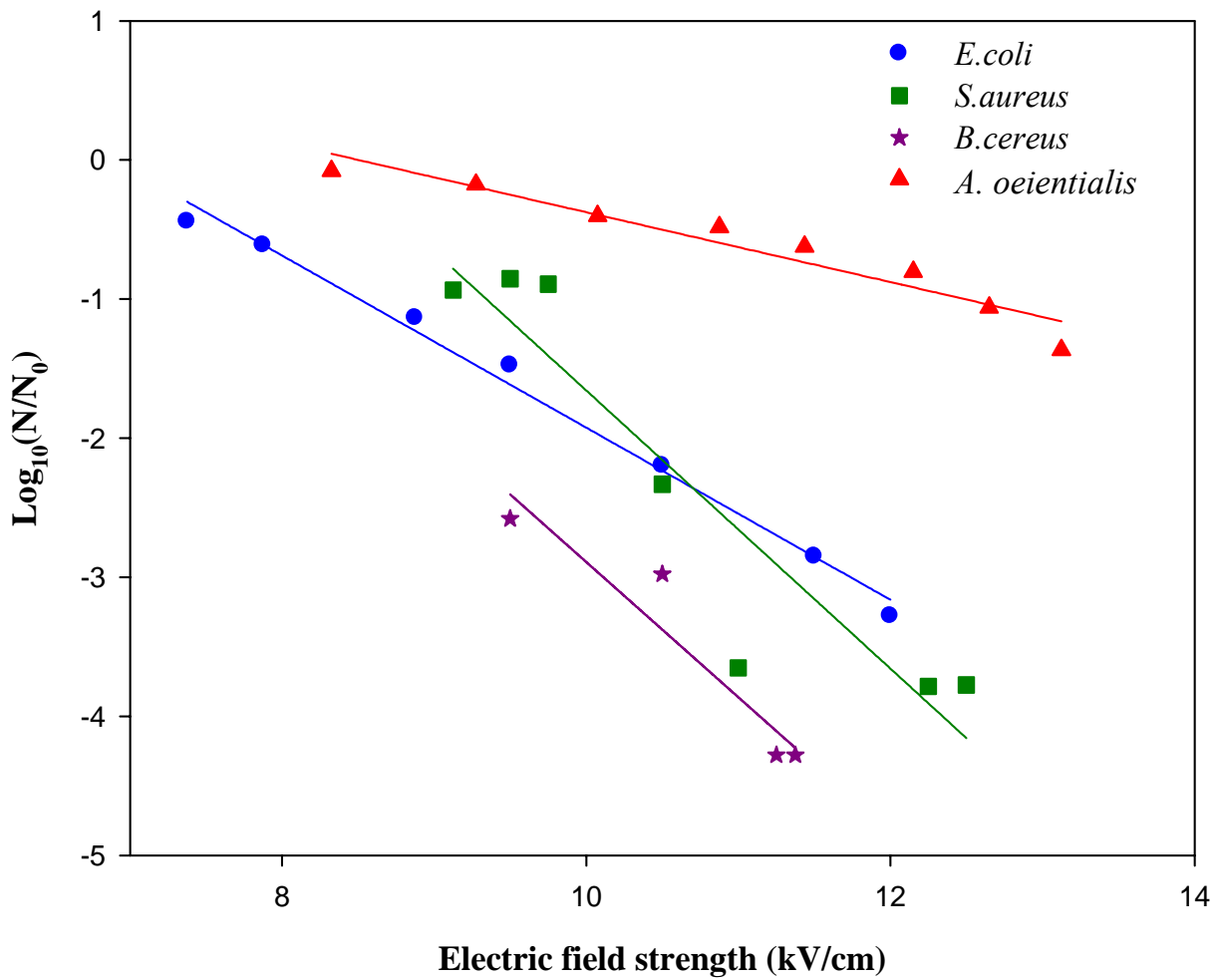
### 三、PEF 對醋酸菌的殺菌效果

由菌相分析結果得知醋酸菌是諾麗果汁發酵過程中的優勢菌群，因此檢測 PEF 對醋酸菌的殺菌效果，以作為 PEF 處理諾麗果汁的依據。將醋酸菌接種至 S&H 液態培養基中於 30°C 培養 2 天，之後系列稀釋至  $10^3$  倍，各取 1 ml 稀釋後菌液至 4 mm 抑菌槽中，分別在脈衝寬度為 6、9  $\mu\text{s}$  時個別施加 8 種電場強度處理，PEF 對醋酸菌的殺菌電氣參數附錄四。結果顯示，當 PEF 將脈衝寬度、電場強度分別為 6  $\mu\text{s}$ 、9  $\mu\text{s}$  與 14.28、13.13 kV/cm 時，醋酸菌最好的殺菌效果分別降低 0.96、1.37  $\log_{10}$  值，皆比其他三株病原菌低，見圖三十四、圖三十五。推測原因可能是醋酸菌生長時會產生醋酸，以致環境導電度值較高，而影響整體的殺菌效果。此外，醋酸菌的大小與金黃葡萄球菌相近(約 0.6~1  $\mu\text{m}$ )，所以需要較高的臨界電場強度才能造成菌體死亡，分別是 8.51、8.50 kV/cm，見表十一，此結果亦顯示脈衝寬度增加對醋酸菌殺菌效果不顯著，必須提高電場強度才能有效殺死該菌種。



圖三十四、比電場強度在 6  $\mu$ s 脈衝寬度的 PEF 殺菌處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌之影響。

Fig. 34 The effect of electric field on the inactivation of *Acetobacter orientalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* by PEF with 6  $\mu$ s pulse wave width.



圖三十五、比電場強度在  $9 \mu\text{s}$  脈衝寬度的 PEF 殺菌處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌之影響。

Fig. 35 The effect of electric field on the inactivation of *Acetobacter orientalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* by PEF with  $9 \mu\text{s}$  pulse wave width.

表十一、脈衝寬度為 6 與 9  $\mu\text{s}$  時，PEF 處理醋酸菌致死所需臨界電場強度。

Table 11. The critical electric fields of *Acetobacter orientalis* at 6、9  $\mu\text{s}$  pulse wave by PEF treatment.

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	<i>Acetobacter sp.</i>		
	$b_E$ (cm / kV)	$E_c$ (kV / cm)	$R^2$
6	0.1277	8.5129	0.85
9	0.2509	8.5029	0.92

註: *Acetobacter orientalis* 經系列稀釋  $10^3$  倍後，起始菌數約為  $10^5$  CFU/ml

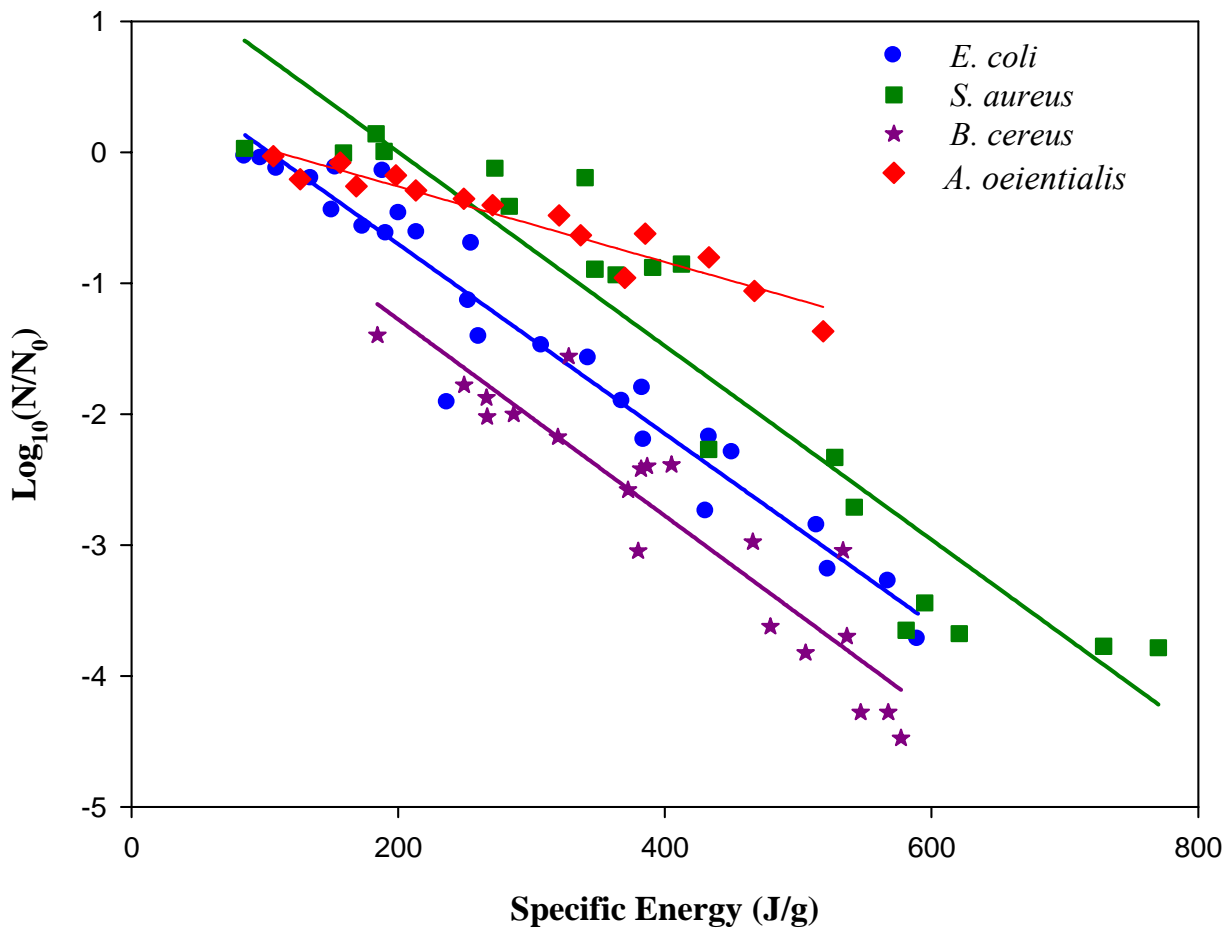


將兩種脈寬度及其施加的電場強度以方程式(3-3)、(3-4)換算成比能量，再與其他三株病原菌相比較，見圖三十六。當輸入能量達 518 J/g 時可下降 1.37 log<sub>10</sub> 值，操作過程溫度未超過 47°C，見表十二，但相較於大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌在相同能量下分別降低 2.98、2.35、3.64 log<sub>10</sub> 值之殺菌效果，有著明顯的差距，若要改善 PEF 對醋酸菌的殺菌效果，首先要降低果汁中的導電度，使操作過程電場強度能提高，亦或是添加一些天然抑菌物質如 nisin 等物質來幫助 PEF 殺菌。

雖然 PEF 對醋酸菌的殺菌效果不如預期，但是仍可採用固定脈衝寬度 6 μs 所得之殺菌回歸公式(4-16)以及表十三來預估 PEF 對醋酸菌的殺菌效果。

$$y = -0.0044x + 0.2789 \quad R^2 = 0.9570 \quad (4-16)$$

結果顯示回歸公式預測值與實際值有一定差距，但將兩者再次取回歸線後發現其  $R^2 = 0.936$ ，見圖三十七，雖然低於其他三株病原菌，但  $R^2$  仍然高於 0.90，因此使用方程式(4-16)搭配方程式(3-3)、(3-4)，即可換算不同殺菌參數來預估 PEF 對醋酸菌的殺菌效果。



圖三十六、比能量對 PEF 處理醋酸菌、大腸桿菌、金黃葡萄球菌、及仙人掌桿菌殺菌效果之影響。

Fig. 36 The effect of specific energy on the inactivation of *Acetobacter orientalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* by PEF treatment.

表十二、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電場強度( $\text{kV/cm}$ )、電流( $\text{A}$ )及比能量( $\text{J/g}$ )的 PEF 對醋酸菌屬殺菌效果及處理後溫度之影響。

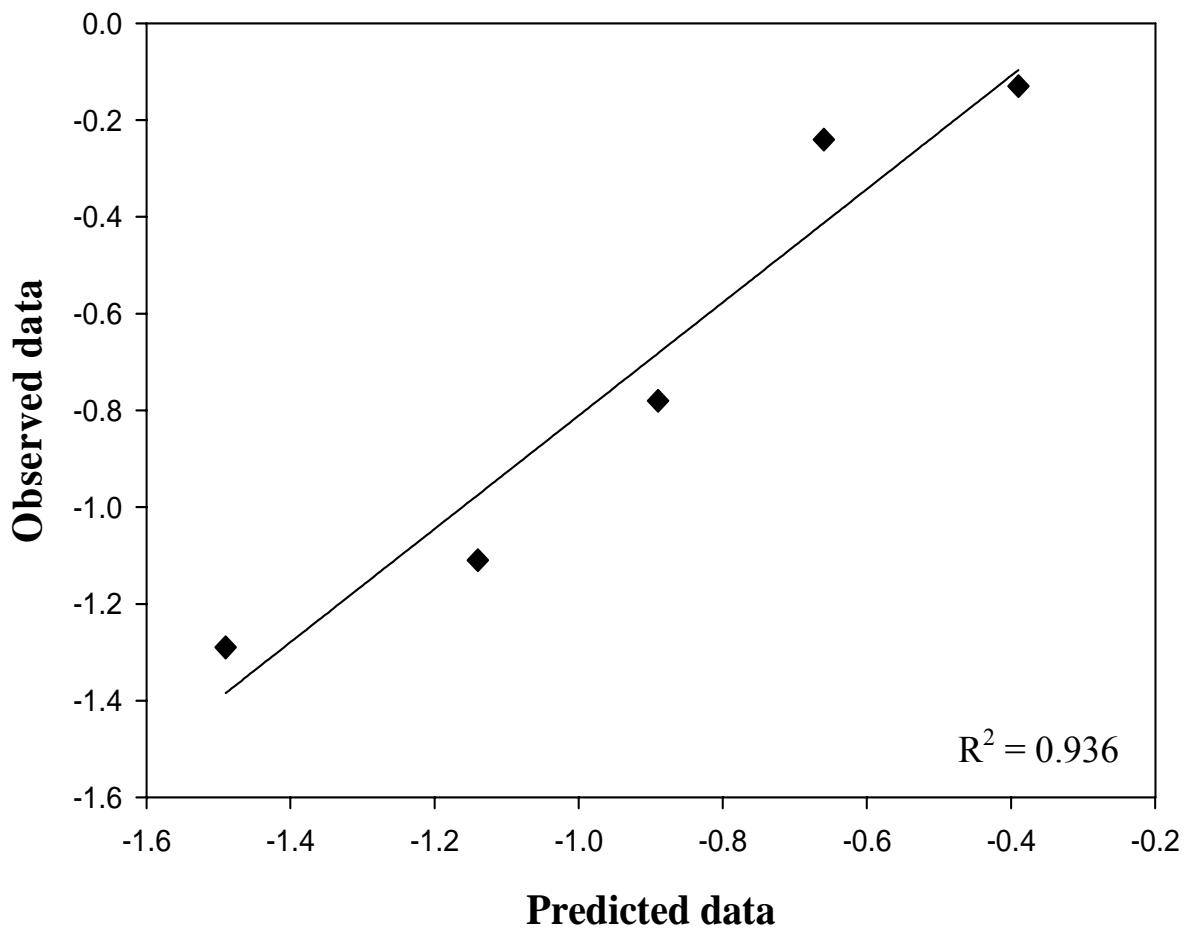
Table 12. The effect of the pulse waves, electric fields, intensity of current, and specific energy on the inactivation of *Acetobacter orientalis* and treated temperature increment.

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Electrical fields ( $\text{kV/cm}$ )	Intensity of current ( $\text{A}$ )	Specific energy ( $\text{J/g}$ )	$\text{Log}_{10}(\text{N}/\text{N}_0)$	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )
6	8.50	0.58	106.49	-0.03	32.20
	9.45	0.62	126.55	-0.21	32.90
	10.55	0.74	168.63	-0.26	34.60
	11.35	0.87	213.29	-0.29	37.80
	12.15	0.95	249.32	-0.36	39.00
	12.95	1.04	290.91	-0.46	40.00
	13.93	1.12	336.87	-0.63	41.60
	14.28	1.20	370.01	-0.96	40.90
9	8.33	0.58	156.44	-0.08	33.40
	9.28	0.66	198.34	-0.18	35.10
	10.08	0.83	270.94	-0.40	38.50
	10.88	0.91	320.64	-0.48	40.00
	11.44	1.04	385.31	-0.62	41.30
	12.15	1.10	433.03	-0.80	44.50
	12.65	1.14	467.24	-1.06	45.60
	13.13	1.22	518.81	-1.37	46.50

表十三、固定脈衝寬度 6  $\mu$ s 的 PEF 處理醋酸菌屬菌數殘存率預測值和實際值之比較。

Table 13. Comparison of the predictive survival values of *Acetobacter orientalis* derived from regression model with measurements.

Specific energy (J/g)	Linear regression: $y = -0.0044x + 0.2789$ $R^2 = 0.957$	
	Prediction	Observation
152.33	-0.39	-0.13
212.45	-0.66	-0.24
265.73	-0.89	-0.78
322.36	-1.14	-1.11
402.41	-1.49	-1.29



圖三十七、PEF 處理的醋酸菌屬殘存率預測值與實測值之相關性。

Fig. 37 The correlation between the predicted survival ratio of PEF treated *Acetobacter orientalis* and measurements.

## 伍、結論

### 一、PEF 的殺菌效果

1. PEF 的殺菌效果會隨脈衝寬度提升而增加。
2. 隨著脈衝寬度提升，可有效降低微生物的臨界電場強度。
3. 本實驗建構的比能量換算公式(3-3)，可以適用於 PEF 殺菌能量參數的換算，且搭配各菌種所得之回歸方程式可用來預估不同輸入能量對特定微生物的殺菌效果。

### 二、諾麗果於控溫下不同發酵時期之微生物變化及 PEF 的處理

1. 諾麗果在 25°C、35°C 下發酵 3 週，微生物即達最高峰，之後便開始大幅下降，其中以 25°C 發酵者，最終菌數約為  $10^5$  CFU/ml 左右，而 35°C 下發酵者則小於 100 CFU/ml，且在整個發酵過程，35°C 下發酵下，菌數皆小於 25°C 溫度下發酵。
2. 透過 16S rDNA 鑑定，發現諾麗果汁在發酵前並無優勢菌群；於 25°C 發酵後優勢菌種則慢慢轉為 *Acetobacter* spp. 與 *Gluconobacter* sp. 直至發酵末期；而 35°C 發酵到了第二週的優勢菌群亦是 *Acetobacter* sp.，但在第三週時則轉為 *Staphylococcus* spp.。廠商發酵之諾麗果汁，其優勢菌群亦是 *Acetobacter* sp.。此外，在發酵過程中亦有一些雜菌，如 *Paenibacillus* spp.、*Bacillus* spp.、*Pantoea* sp.、*Microbacterium testaceum* 以及 *Curtobacterium* spp. 等，但因果汁 pH 值只有 3.5，導致這些雜菌不易生長。
3. 將醋酸菌屬施以不同脈衝寬度、電場強度的 PEF 處理，發現 PEF 對醋酸菌殺

菌效果不好，最多降低  $1.37 \log_{10}$  值，推測是因為環境導電度太高，導致所施加的電場強度無法提升太多，且諾麗果汁發酵後亦會因微生物生長代謝，而產生許多導電物質，因此 PEF 要應用於發酵後諾麗果汁殺菌，則仍有許多要克服的地方。

## 陸、參考文獻

1. 王美燕 (2008) 部分發酵諾麗果汁之製備及其儲藏性探討 私立東海大學食品科學研究所碩士論文 台中
2. 施瑋筑 (2009) 檫樹果實自然發酵過程中菌相與果汁成分變化之研究 國立台灣大學生物資源暨農學院園藝學研究所碩士論文 台北
3. 陳富民 (2007) 諾麗(Noni)果汁最佳發酵條件之探討 國立屏東科技大學機械工程系碩士論文 屏東
4. 黃慧玲、李繼永、蔣江云 (2003) 諾麗果中脂肪酸成分與含量的分析 熱帶作物學報 24(1):73-75
5. 廖敏伶 (2002) 楊桃細菌性斑點病菌之存活與其拮抗細菌 *Pantoea dispersa* CL166 之防治潛力 國立中興大學植物病理學系碩士論文 台中
6. Ade-Omowaye, B. I. O., Angersbach, A., Eshtiaghi, M. N., and Knorr, D., (2001) Impact of high intensity electric field pulses on cell permeabilisation and as pre-processing step in coconut pressing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1:203–209.
7. Allen, M., and Soike, K., (1967) Disinfection by electrohydraulic treatment. *Science* 156:524–525.
8. Anonymous., (1987) Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. Maxwell Laboratories, Inc., San Diego, U.S., U.S. patent 4695472.
9. Arab, L., and Steck, S., (2000) Lycopene and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(6):1691S–1695S.
10. Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B. R., and Rönner, U., (2001) Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2: 41–54.
11. Balasa, A., and Knorr, D., (2006) Extraction of total phenolics from grapes in correlation with



- degree of membrane poration. *COST meeting 928-300606*, Reykjavik, Island.
12. Barbosa-Canovas, G. V., Gongora-Nieto, M. M., Pothakamury, U. R., Swanson, B.G. (1999) Preservation of foods with pulsed electric fields. Academic Press Ltd. London.
  13. Barbosa-C´anovas, G. V., and Altunakar, B., (2007) Pulsed electric fields processing of foods: an overview. *Pulsed electric fields technology for the food industry*, J. Raso and V. Heinz, eds., Springer Verlag.
  14. Bazhal, M., and Vorobiev, E., (2000) Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1668–1674.
  15. Bazhal, M. I., Ngadi, M. O., Raghavan, G. S. V., and Smith, J. P., (2006) Inactivation of *Escherichia coli* O57:H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments. *London Weekend Television* 39: 419–425.
  16. Beattie, J. M., and Lewis, F. C., (1925) The electric current (Apart from the Heat Generated). A Bacteriological Agent in the Sterilization of Milk and other fluids. *Journal of Hygiene* 24:123–137.
  17. Bendicho, S., Espachs, A., Aránategui, J., and Martín, O. (2002) Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research* 69: 113–123.
  18. Best, R. J., (1994) Studies on a fluorescent substance present in plants. 2. Isolation of the substance in a pure state and its identification as 6-methoxy-7-hydroxy 1: 2 benzo-pyrone. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 22: 251-255.
  19. Braddock, R. J., (1999) Handbook of citrus by-products and processing technology (pp. 53–83). New York: John Wiley & Sons.
  20. Butz, P. and Tauscher, B., (2002) Emerging technologies: Chemical aspects, *Food Research International* 35:279–284.
  21. Calabrò, M. L., Tommasini, S., Donato, P., Stancanelli, R., Raneri, D., Catania, S., Costa, C., Villari, V., Ficarra, P. and Ficarra, R. (2005) The rutin/ $\beta$ -cyclodextrin interactions in fully

aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36:1019-1027.

22. Castro, A. J., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G., (1993) Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 17:47-73.
23. Chan, B., Valillant, Y., Perez, F., Belleville, A.M., Zuniga, M.-P., C. and Brant, P. (2007) The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia L.*): microbiological flora and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1710-1716.
24. Cserhalmi, Zs., Vid'acs, I., Beczner, J., Czukor, B., (2002) Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3:41-45.
25. Davey, M. W., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., et al., (2000) Plant L-ascorbic: Chemistry, function, metabolism, bioavailable and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825–860.
26. De Haan, S. W. H., Willcock, P. R., (2002) Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 349-356.
27. Dittmar, A., 1993. *Morinda citrifolia L.*—Use in indigenous Samoan medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants* 1:77–92.
28. Doenenburg, H., and Knorr, D., (1993) Cellular permeabilisation of cultured plant tissue by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. *Food Biotechnology* 7(1):35–48.
29. Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., & Grolier, P., (2003) Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(5):369–382.
30. Dutrueux, N., Notermans, S., Wijtzes, T., Góngora-Nieto, M. M., Barbosa-

- Cánovas, G. V., and Swanson, B. G. (2000) Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living *Escherichia coli* and *Listeria innocua* under several conditions, *International Journal of Food Microbiology* 54: 91–98.
31. Elez-Martínez, P., and Martín-Belloso, O., (2005) Food safety aspects of pulsed electric field. In D. W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing*. 183-218.
32. Eshtiaghi, M. N., and Knorr, D. (2000). Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse zum Zellaufschluss bei der Saftgewinnung am Beispiel von Weintrauben. *LVT* 45, 23–27.
33. Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H., Richter, E.R., (2004) Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Biosystems Engineering* 87:137-144.
34. Fetterman, J. C., (1928) The electrical conductivity method of processing milk. *Agricultural Engineering* 9(4):107–108.
35. Food and Drug Administration (FDA), (2001) Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In: *Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce*. Chapter IV, <http://www.cfsan.fda.gov>. Accessed 09-21- 2005.
36. Fincan, M., and Dejmek, P., (2003) Effect of osmotic pretreatment and pulsed electric field on the viscoelastic properties of potato tissue. *Journal of Food Engineering* 59:169–175.
37. Fincan, M., DeVito, F., and Dejmek, P., (2004) Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering* 64:381–388.
38. Fleischman, G. J., Ravishankar, S., and Balasubramaniam, V. M.. (2004) The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology*.21: 91–95.
39. Fox, M.B., Esveld, D.C., Mastwijk H., Boom, R.M., (2008) Inactivation of *L. plantarum* in a PEF microreactor: the effect of pulse width and temperature on the inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:101-108.

40. Gemma, O. O., Isabel, O. S., Robert, S. F., Olga, M. B., (2009) Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. *Food Chemistry* 115:1312–1319.
41. Gilliland, S. E., and Speck, M. L., (1967) Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock. *Applied Microbiology* 15(5):1038–1044.
42. Guderjan, M., and Knorr, D., (2005) Application of pulsed electric fields for the development of a gentle processing concept for the recovery of oils of plant origin. *DFG Projekttreffen Fette und Lipide in der Ernährung*, Freudenstadt, Germany.
43. Guderjan, M., Elez-Martínez, P., and Knorr, D., (2007) Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8:55–68.
44. Hafsteinsson, H., Gudmundsson, M., Arnarson, G. O., Jo´nsson, A., and Siguroardottir, M. S., (2000) High electric field pulses: food safety; quality; and critical parameters. Project report. European project *FAIR CT97-3044*.
45. Hang, H. C., Erickson, R. S., Hsieh, T.F., (2007) Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. *Crop Protection* 26 :1055–1061.
46. Heinz, V., Toepfl, S., Knorr, D., (2003) Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4 :167–175.
47. Hiramatsu, T., Imoto, M., Koyano, T., Umezawa, K., (1993) Induction of normal phenotypes in RAS transformed cells by damnacanthol from *Morinda citrifolia*. *Cancer Letters* 73:161–166.
48. Hirazumi, A., Furusawa, E., (1999) An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with antitumor activity. *Phytotherapeutic Research* 13:380–387.

49. Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D. and Griffiths, M.W., (1995) Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science* 60 : 1337-1343.
50. Ho, S. Y. , Mittal, G. S. and Cross, J. D. (1997) Effects of high field electric pulses on the activity of selected enzymes. *Journal of Food Science* 31:69-84.
51. Hodgins, A. M., Mittal, G. S., and Griffiths, M. W., (2002) Pasteurization of fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field. *Journal of Food Science* 67: 2294–2299.
52. Hüischer, H., Potel, J., and Niemann, E.-G., (1981) Killing of Bacteria with Electric Pulses of High Field Strength. *Radiation and Environmental Biophysics* 20:53-65.
53. Hüischer, H., Potel, J. and Niemann, E. G. (1983) Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22 : 149-162.
54. Isabel, O. S., Robert, S. F., Olga M. B., (2008) Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Food Science and Emerging Technologies* 9:272–279.
55. Iu, J., Mittal, G. S., and Griffiths, M. W., (2001) Reductions in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection* 64: 964–969.
56. Jaeger, H., Blasa, A., and Knorr, D., (2008) Food industry application for pulsed electric fields. *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*, DOI:10.1007/-78-0-387-79374-0-7.
57. Janositz, A. (2005) Auswirkung von Hochspannungsimpulsen auf das Schnittverhalten von Kartoffeln., Diploma thesis, University of Technology, Berlin.
58. Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., and Holley, R. A.,(1999) Pulsed electric field processing of foods:a review. *Journal of Food Protection* 62(9):1088–1096.
59. Jonathan, M. M., Rosa Martina, R. M., Olga, M. B., (2007) Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations

- inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 117:192-200.
60. Jonathan, M. M., Rosa Martina, R. M., Olga, M. B., (2008 A) Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9:328-340.
61. Jonathan, M. M., Pedro, E. M., Rosa Martina, R. M., Olga, M. B., (2008 B) Effects of Pulsed Electric Fields on Pathogenic Microorganisms of Major Concern in Fluid Foods: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:747–759 .
62. Keith, W. D., Harris, L. J. and Hudson, L., (1997) Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spice. *Food Research International* 30 : 185-191.
63. Kelly, J. K., Siripong, S., McCormack J., Janus, R. L., Urakawa, H., Fantroussi, A. E., Noble, P. A., Sappelsa, L., Rittmann, B. E., Stahl, D. A., (2005) DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Research* 39: 3229–3238.
64. Lebovka, N. I., Praporscic, I., and Vorobiev, E., (2004) Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 5(1):9–16.
65. Levand, O. and Larson, H., (1979) Some chemical constituents of *Morinda citrifolia*. *Plant medica* 36:186-187.
66. Liang, Z., Mittal, G. S., and Griffiths, M.W., (2002) Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection* 65: 1081–1087.
67. Limyati, D.A.,B. L. L. Juniar., (1998) Jamu Gendong, a kind of traditional medicine in Indonesia: the microbial contamination of its raw materials and endproduct. *Journal of Ethnopharmacology* 63:201-208.
68. Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Rashed, K., Statti, G. A., Hufner, A. and Menichini, F., (2007) Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) by Flavonoids isolated from

*Ailanthus excelsa* (Roxb) 152 (Simaroubaceae). *Phytother. Res.* 21:32-36.

69. Loeffler, M., Schmidt, W., Schuhmann, R., Röttering, A., Neumann, J., and Dreesen, C., (2001) Treatment of sewage sludge with pulsed electric fields. *International conference on pulsed power applications*, Gelsenkirchen, Germany.
70. Loske, A. M., Prieto, F. E., Zavala, M. de Lourdes, Santana A. D., Armenta E., (2002) Repeated application of shock waves as a possible method for food preservation. In fact sheet: IFUNAM – Física Aplicada, Salvat, Mexico City.
71. Malicki, A., Oziemblowski, M., Molenda, J., Trziszka, T., and Bruzewicz, S., (2004). Effect of pulsed electric field (PEF) on *Escherichia coli* within the liquid whole egg. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy.* 48:371–373.
72. Marquez, V. O., Mittal, G. S., Griffiths, M. W., (1997) Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage pulsed electric field. *Journal of Food Science* 2:399-402.
73. Martín-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B. L. Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V., and Swanson, B.G., (1997) Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation* 21:193-208.
74. Mazurek, B., Lubicki, P., and Staroniewicz, Z., (1995) Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Transactions Dielectrics Insulation* 2:418-425.
75. McDonald, C. J., Lloyd, S.W., Vitale, M. A., Petersson, K., Innings, F., (2000) Effect of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm. *Journal of Food Science* 65:984-989.
76. Miller, J. F., Dower, W. J., and Tompkins, L. S., (1988) High-voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:856-860.
77. Mitchell, C. A., (1996) Recent advances in plant response to mechanical stress: theory and application. *Horticultural Science* 31(1):31–35.
78. Mittal, G. S., & Griffiths, M.W., (2001). Pulsed electric field processing of liquid

- foods and beverages. In D. W. Sun (Ed.), *Emerging technologies for food processing* : 99–139.
79. Mohd, Z., Abdul-Hamid, A., Osman, A., (2001) Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry* 78, 227–231.
80. Moses, B. D., (1938) Electric pasteurization of milk. *Agricultural Engineering* 19(12):525–526.
81. Nelson, S. C., and Elevitch, C. R., (2006) Noni: The Complete Guide for Consumer and Growers. Permanent Agriculture Resources (PAR). USA.
82. Nicoli, M. C., Anese, M., & Parpinel, M., (1999) Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 10(3):94–100.
83. Odriozola-Serrano, I., Bendichio-Porta, S., and Martín-Belloso, O., (2006) Comparative study on shelf-life of whole milk processed by high intensity pulsed electric field or heat treatment. *Journal of Dairy Science* 89: 905–911.
84. Ohsima, T., Tamura, T., Sato, M., (2007) Influence of pulsed electric field on various enzyme activities. *Journal of Electrostatics* 65:156-161.
85. Ojewole, J. A. O. and Adesina, S. K. (1983) Mechanism of the hypotensive effect of scopoletin isolated from the fruit of *Tetrapleura tetraptera*. *Planta Med.* 49 (1):46-50.
86. Phusique & Industrie: A new technology for food sterilization and Gas / Liquid decontamination: pulsed power sterilization research report.
87. Picart, L., Dumay, E., and Cheftel, J. C., (2002). Inactivation of *Listeria innocua* in dairy fluids by pulsed electric fields: influence of electric parameters and food composition, *Innov. Food Science and Emerging Technologies*. 3:357–369.
88. Prochownick, L., and Spaeth, F., (1890) Über die keimtötende Wirkung des galvanischen Stroms. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 26: 564–565.



89. Puértolas, E., Lopez, N., Condon, S., Raso, J., Alvarez I., (2009) Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 130 :49–55.
90. Qin, B. L. , Zhang, Q. , Barbosa-Canovas, G.V. , Swanson, B.G. and Pedrow, P. D. (1994) Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields with different voltage waveformms. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 44 .1 : 1047-1051.
91. Qin, B. L. , Barbosa-Canovas, G. V. , Swanson, B.G. and Pedrow, P. D. (1998) Inactivating microorganism using a pulsed electric field continuous treatment system. *IEEE Transactions on Industry Applications* 34 : 43-49.
92. Rao, A. V., & Agarwal, S., (1999) Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the preservation of chronic diseases: A review. *Nutritional Research* 19(2): 305–323.
93. Rastogi, N. K., Eshtiaghi, M. N., and Knorr, D. (1999). “Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. *Journal of Food Science* 64(6):1020–1023.
94. Ravishankar, S., Fleischman, G. J., Balasuramianam, V. M., (2002) The inactivation of *Escherichia coli O157:H7* during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology* 19:351-361.
95. Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., & Martín-Belloso, O., (2006). Inactivation of *E. coli O157:H7*, *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* by combining of high-intensity pulsed electric fields and malic acid in apple juice. *Workshop on Applications of novel technologies in food and biotechnology*. 11–13.
96. Sale, A. J. H., and Hamilton, W. A., (1967) Effect of high electric fields on micro-organisms. I. Killing of bacteria and yeast. II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochimica Biophysica Acta* 148:781–800.
97. Saludes, J.P., Garson, M.J., Franzblau, S.G., Aguinaldo, A.M., (2002) Antitubercular constituents

- from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). *Phytotherapeutic Research* 16:683–685.
98. Sang, S., Wang, M. and Ho, C. T., (2000) Analysis of chemical compounds in noni fruits (*Morinda citrifolia*), 220<sup>th</sup> ACS National Meeting. August 20-24.
99. Schoenbach, K. H. , Peterkin, F. E. , Alden, R. W. and Beebe, S. J. (1997) The effect of pulsed electric fields on biological cells : Experiments and applications. *IEEE Transaction Plasma Science* 25 : 284-292.
100. Schramm, M. and Hestrin, S., (1954) Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *Journal of General Microbiology* 11:123-129.
101. Seidemann, J., (2001) Noli:questionable magic fruit from the South Seas. *Pharmazeutische Zeitung* 146(40):36-40.
102. Smith, K., Mittal, G. S., & Griffith, M. W., (2002). Pasteurization of milk using pulsed electric field and antimicrobials. *Journal of Food Science* 67:2304–2308.
103. Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., (1973) in *Numerical Taxonomy* (pp; 230-234), W.H. Freeman and Company, San Francisco, California, USA.
104. Sobrino, A., Rosell, J. R., Bendichio, S., Sanchis, V., and Martín, O., (2001) Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in skim milk by pulsed electric fields and moderate heating. **In:** *NIZO Dairy Conference on Food Microbes*. P-121. Elsevier Science & NIZO Food Research, Ede, The Netherlands, 2001.
105. Sobrino-López, A., Raybaudi-Massilia, R., Martín-Buloso, O., (2006) High-intensity pulsed electric field variables affecting *Staphylococcus aureus* inoculated in milk. *Journal of Dairy Science* 89:3739-3748.
106. Stahl, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for human? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 336(1), 1–9.

107. Stapulionis, R., (1999) Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 48:249-254.
108. Thiele, H., and Wolf, K. (1899). Über die Einwirkung des elektrischen Stroms auf Bakterien. *Centralblatt Bakterien und Parasitenkunde*. 25:650–655.
109. Toepfl, S., Heinz, V., and Knorr, D., (2005) Anwendung gepulster elektrischer Felder als Zellaufschluss- und Konservierungsverfahren. *GDL Kongress Lebensmitteltechnologie* Dresden.
110. Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D., (2007) High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing* 46:537–546.
111. Umezawa, K. (1992) Isolation of 1-methoxy-2-formyl-3-hydroxyanthraquinone from *Morinda citrifolia* and neoplasm inhibitors 157 containing the same. Japan Kokai Tokyo Koho J P 06 87, 736 (94-87,736).
112. Unal, R., Yousef, A. E., and Dunne, C. P., (2002) Spectrofluorimetric assessment of bacterial cell membrane damage by pulsed electric field. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 3:247-254.
113. USDA, U. S. Food and Drug Administration., (2002) Exemptions from the warning label requirement for juice — Recommendations for effectively achieving a 5-log reduction. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/juicgui2.html> Accessed February 21, 2007.
114. Van Loey, A., Verachert, B., and Hendrickx, M., (2002) Effect of HPEF on enzymes. *Trends in Food Science & Technology* 12:94-102.
115. Vega-Mercado, H., Pothakamury, U. R., Chang, F.-J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G., (1996) Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Research International* 29 (2) : 117-121
116. Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D.A., Riener, J., Lyng, J.G., Morgan, D.J., (2008) Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 89 :267–273.
117. Wang, M., Kikuzaki, H., Jin, Y., Nakatani, N., Csiszar, K., Boyd, C., Rosen, R. T., Ghai, G., and

- Ho, C. T., (2000) Novel glycosides from noni (*Morinda citrifolia*). *Journal of natural products* 63:1182-1183.
118. Wouters, P. C., Alvarez, I., and Raso, J., (2001) Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing, *Trends Food Science and Technolnology* 12: 112–121.
119. Yanine, C.B., Fabrice, V., Perez, A. M., Reynes, M., Brilloret, J.M., Brant, P., (2006) The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:645-654.
120. Yanine, C.B., Fabrice, V., Perez, A. M., Reynes, M., Brillouet, M. P., Zúñiga, C., and Brat, P., (2007) The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.):microbiological flora and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 57: 1710-1716.
121. Yeom, H. W., Streaker, C. B., Zhang, Q. H., and Min, D. B., (2000) Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 4597–4605.
122. Yu, H., Li, S., Huang, M. T. and Ho, C. T. (2004) Anti-inflammatory constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) fruits. IFT Annual Meeting 33F-28, July 12-16 Las Vegas, NV.
123. Zhao, W., Yang, R., Lu, R., Wang, M., Qian, P., Yang, W., (2008) Effect of PEF on microbial inactivation and physical–chemical properties of green tea extracts. *London Weekend Television* 41:425-431.
124. Zhong, K., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Liao, X., Hu, X., (2005) Inactivation ad kinetic for the *Escherichia coli* treated by a co-axial pulsed electric field. *European Food Research and Technology* 221:752-758.
125. Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., (1974) Dielectric breakdown in cell membranes. *Biophysical Journal*:881-899.
126. Zimmermann, U., (1986) Electrical breakdown, electropemeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology* 105:175-256

127. Zimmermann, U., (1996) The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications, in: Zimmermann, U., Neil, G. A. (Eds.), *Electromanipulation of Cells*, CRC Press, Boca Raton:1-100
128. Zin, Z. M., Abdul-Hamid, A. and Osman, A. (2002) Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry* 78: 227-231.

## 柒、附錄

因為有諾麗果發酵模式室溫自然發酵、控溫發酵以及廠商發酵等，因此，針對各自分離之微生物施以編號表示。

室溫自然發酵者編號為：「BW01」、「BM01」系列，其中「BW01」系列是自行發酵(1~4週)，如 BW01、BW22a 等；而「BM01」是直接自行發酵一個月，如 BM01a、BM01c 等。

控溫發酵之菌種編號為「PCB1」、「PC251」、「PC351」系列，其中「PCB1」屬於未發酵前之菌種，如 MRB1-1、PCB1-3 等；而「PC251」、「PC252」則表示該菌種是於 25°C 發酵不同時間，個別培養在不同培養基中分離而得，如 PC251-1、PD252-2、PC253-2、MR254-1 等；「PC351」系列則是從 35°C 發酵中分離之菌種，其編號為「PC351-1」、「MR352-1」、「PC353-1」等。

廠商自行發酵者為：「BM06」、「PC1A」系列，其中「BM06」系列是果汁發酵後放置一段時間再取樣分離之菌種編號，如 BM06a、BM36c 等；而「PC1A」系列則是廠商發酵後，立即取樣培養分離之菌種編號，如 PC1B、MR1A 等。

由於本實驗有四種培養基 PCA、PDA、MRS、FTMA，所以編號前兩字母有所區別。

附錄一、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電壓(kV)、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對大腸桿菌處理之參數。

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Peak Voltage (kV)	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)
3	3.8	9.50	0.83	85.16
	4	10.00	0.9	97.20
	4.4	11.00	0.92	109.30
	4.8	12.00	1.04	134.78
	5.15	12.88	1.25	173.81
	5.45	13.63	1.3	191.30
	5.85	14.63	1.5	236.93
6	3.55	8.88	0.8	153.36
	3.8	9.50	0.92	188.78
	4.2	10.50	1.09	247.21
	4.6	11.50	1.05	260.82
	4.8	12.00	1.42	368.06
	5.05	12.63	1.59	433.59
	5.25	13.13	1.59	450.77
9	2.95	7.38	0.63	150.54
	3.15	7.88	0.84	214.33
	3.55	8.88	0.88	253.04
	3.8	9.50	1	307.80
	4.2	10.50	1.13	384.43
	4.6	11.50	1.38	514.19
	4.8	12.00	1.46	567.65
12	2.95	7.38	0.63	200.72
	3.15	7.88	0.75	255.15
	3.45	8.63	0.92	342.79
	3.55	8.88	1	383.40
	3.8	9.50	1.05	430.92
	4	10.00	1.21	522.72
	4.2	10.50	1.3	589.68

附錄二、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電壓(kV)、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對金黃葡萄球菌處理之參數。

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Peak Voltage (kV)	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)
3	3.70	9.25	0.85	84.92
	4.60	11.50	1.28	158.98
	5.20	13.00	1.35	189.54
	5.80	14.50	1.74	272.48
	6.30	15.75	2.00	340.20
6	3.30	8.25	1.03	183.55
	4.20	10.50	1.25	283.50
	4.70	11.75	1.54	390.85
	4.80	12.00	1.67	432.86
	5.20	13.00	1.93	541.94
	5.40	13.50	2.04	594.86
	5.50	13.75	2.09	620.73
9	3.65	9.13	1.23	363.65
	3.80	9.50	1.34	412.45
	3.90	9.75	1.10	347.49
	4.20	10.50	1.55	527.31
	4.40	11.00	1.63	580.93
	4.90	12.25	1.94	769.99
	5.00	12.50	1.80	729.00



附錄三、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電壓(kV)、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對仙人掌桿菌處理之參數。

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Peak Voltage (kV)	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)
3	5.10	12.75	1.34	184.52
	5.60	14.00	1.65	249.48
	5.80	14.50	1.70	266.22
	6.00	15.00	1.77	286.74
	6.20	15.50	1.91	319.73
	6.45	16.13	2.22	386.61
6	4.15	10.38	1.19	266.68
	4.40	11.00	1.38	327.89
	4.75	11.88	1.49	382.19
	5.00	12.50	1.50	405.00
	5.10	12.75	1.74	479.20
	5.40	13.50	1.84	536.54
9	3.80	9.50	1.21	372.44
	4.20	10.50	1.37	466.07
	4.50	11.25	1.50	546.75
	4.55	11.38	1.54	567.57
12	3.35	8.38	1.05	379.89
	3.40	8.50	1.12	411.26
	3.60	9.00	1.30	505.44
	3.90	9.75	1.37	577.04



附錄四、不同脈衝寬度( $\mu\text{s}$ )、電壓(kV)、電場強度(kV/cm)、電流(A)及比能量(J/g)的 PEF 對醋酸菌屬處理之參數。

Pulse wave ( $\mu\text{s}$ )	Peak Voltage (kV)	Electrical fields (kV/cm)	Intensity of current (A)	Specific energy (J/g)
6	3.4	8.50	0.58	106.49
	3.78	9.45	0.62	126.55
	4.22	10.55	0.74	168.63
	4.54	11.35	0.87	213.29
	4.86	12.15	0.95	249.32
	5.18	12.95	1.04	290.91
	5.57	13.93	1.12	336.87
	5.71	14.28	1.20	370.01
9	3.33	8.33	0.58	156.44
	3.71	9.28	0.66	198.34
	4.03	10.08	0.83	270.94
	4.35	10.88	0.91	320.64
	4.57	11.44	1.04	385.31
	4.86	12.15	1.10	433.03
	5.06	12.65	1.14	467.24
	5.25	13.13	1.22	518.81