

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.

非熱電能殺菌效果之探討

The effect of non-thermoelectric treatment on microbial reduction

研究生：周昱仁 撰

Graduate Student : Yu-Zen Chou

中華民國一百零一年十一月

November , 2012

謝 誌

在研究所的時間裡，李家生活所學到的不僅是在實驗上，在做人處事的態度及觀念也有了更深一層的體會。這段時間裡我最感謝李家的大家長李根永老師、徐家的大家長徐詮亮老師以及長庚大學電機系的曾聖有老師還有在學業上的幫忙及教導。

在東海的時間裡要感謝的人太多，包括了大學時的班導師顏文義老師跟陳景榮老師，還有其他專任老師及助教們，感謝你們在我大學及研究所的時間裡的不論在課業方面上或在生活方面上都有很大的幫忙。

在實驗期間，要感謝給我幫助的人，包括學長洪崇聖、張展維、陳冠閔、林建廷、劉耀寬等等，同學阿吩、碰碰、大丁、惠旻、小新、許小白、紹偉、書平、鈺萍、鈺欣。另外要感謝最支持我的自由小隊隊員 YA YA、大寶、阿 G、羊咩。還有幫我的學弟妹們一立、佩萱、杜杜、小白以及林口長庚的同仁們，阿宗、冠偉、宜仁、阿鴻、屁股以及其他新進學弟們。

最後要感謝我的爸媽及老姊，給我繼續往前的力量，感謝我最棒的老哥，凱哥，教我甚麼叫作執行力，在這裡獻上我最誠摯的謝謝，謝謝大家。

周昱仁 2013.2.1 於台中

目錄

摘要.....	I
Abstract	II
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	2
一、脈衝電場殺菌.....	2
(一) 脈衝電場殺菌作用原理.....	2
(二) 影響脈衝電場效果之因子.....	4
(三) 脈衝電場設備的基本結構.....	7
(四) 國內研製的脈衝電場裝置.....	10
(五) PEF 應用於流體食品殺菌.....	12
二、電漿殺菌.....	13
(一) 電漿殺菌作用原理.....	13
(二) 影響電漿殺菌效果之因子.....	15
(三) 電漿設備的基本結構.....	16
(四) 電漿殺菌.....	18
參、實驗材料與方法.....	19
一、實驗材料.....	19
(一) 試驗菌株.....	19
(二) 藥品及培養.....	19

(三) 儀器設備	19
二、實驗方法	27
(一) 實驗大綱	27
(二) 實驗架構	27
(三) 培養基之製備	28
(四) 測試 PEF 的殺菌效率	29
(五) 測試電漿的殺菌效率	31
肆、結果與討論	32
一、PEF 對食品中毒病原菌的殺菌效果	32
(一) PEF 處理條件測定	32
(二) 循環式脈衝殺菌系統對大腸桿菌及金黃葡萄球菌的殺菌效果	38
二、電漿對食品中微生物的殺菌效果	41
(一) 輸入電壓對殺菌效果之影響	42
(二) 25kV 電漿殺菌效果	46
(三) 利用電漿處理番茄腐敗菌	53
伍、結論	59
陸、參考文獻	60

圖目錄

圖一、細胞膜形成孔洞的示意圖。.....	2
圖二、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。.....	4
圖三、脈衝電場系統示意圖。.....	7
圖四、PEF 處理槽。.....	9
圖五、寬脈波 PEF 殺菌系統。.....	11
圖六、三相殘留曲線與每相的作用機制。.....	14
圖七、電漿系統概略圖。.....	17
圖八、循環式脈衝電場系統硬體架設及配置圖。.....	20
圖九、循環式脈衝電場系統配置圖。.....	21
圖十、系統指數波波形.....	22
圖十一、電極管的概略圖。.....	23
圖十二，電漿供電系統及氣體流量控制儀。.....	25
圖十三，電漿處理槽。.....	26
圖十四、殺菌管的殺菌效果。.....	33
圖十五、使用不同放電電容時，系統的殺菌效果。.....	35
圖十六、不同介質的殺菌效果。.....	37
圖十七、循環式脈衝電場對於大腸桿菌的殺菌效果。.....	39

圖十八、循環式脈衝電場對於金黃葡萄球菌的殺菌效果。	40
圖十九、電壓對應能量。	42
圖二十、不同的輸入電壓(kV)對大腸桿菌的殺菌效力。	43
圖二十一、不同的輸入電壓(kV)對金黃葡萄球菌的殺菌效力。	44
圖二十二、不同的輸入電壓對 THU-Y1 的殺菌效力。	46
圖二十三、不同處理時間對大腸桿菌的殺菌效力。	47
圖二十四、不同的處理時間對沙門氏菌的殺菌效力。	48
圖二十五、不同的處理時間對金黃葡萄球菌的殺菌效力。	49
圖二十六、比較不同處理時間對仙人掌桿菌的殺菌效力。	50
圖二十七、不同的處理時間對 THU-Y1 的殺菌效力。	51
圖二十八、經 30 kV 電漿處理後培養一天的黴菌。	54
圖二十九、經 30 kV 電漿處理後培養兩天的黴菌。	55
圖三十、經 30 kV 電漿處理後培養三天的黴菌。	56
圖三十一、經 30 kV 電漿處理後培養十天的黴菌。	57
圖三十二、經 30 kV 電漿處理後培 4 十天的黴菌背面。	58

表目錄

表一、電漿之種類。	16
-----------------	----

摘要

非熱電能殺菌是一項新興的加工技術，具有節能及保留食品原有品質的優點。本研究探討脈衝電場(Pulsed electric fields, PEFs)及電漿(Plasma)兩種非熱電能殺菌系統之殺菌效果。影響 PEF 殺菌效果有許多參數，包括了處理時間、電場強度、樣品導電度等。本研究使用指數脈衝波殺菌管的處理裝置，將流體樣品循環通過殺菌管連續處理。為比較不同電場能量的殺菌效率，殺菌管電路中分別採用放電電容 5.5kV 及 5.0kV。以大腸桿菌為測試菌株測定此系統的殺菌效率，結果顯示 5.5kV 放電電容條件下處理 30 分鐘後，菌數下降 1.97 log₁₀ 值，5.0kV 放電電容系統則為 1.10 log₁₀ 值，此結果顯示電場能量對殺菌效率有明顯的影響。5.5kV 放電電容系統處理金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 30 分鐘，菌數下降 1.22 log₁₀ 值，可能是金黃葡萄球菌對 PEF 抗性較強之故。檢測導電度對殺菌效率的影響，將大腸桿菌的水懸浮液及 NB(nutrient broth) 懸浮液分別連續循環通過殺菌管處理，結果測得水懸浮液菌數下降 1.97 log₁₀ 值，NB 懸浮液下降 0.14 log₁₀ 值，此結果顯示導電度較大的 NB 懸浮液殺菌效率較弱。本研究亦探討了影響電漿殺菌的電壓、處理時間及菌體的性質。以大腸桿菌、金黃葡萄球菌、沙門氏菌及仙人掌桿菌作為測試菌株。電壓愈大殺菌效果愈強，25kV 輸入電壓處理 3 分鐘，大腸桿菌、金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌，菌數下降分別為 3.37、3.25、1.99 log₁₀ 值，沙門氏菌處理 2 分鐘後，菌數即可下降 3.35 log₁₀ 值。此結果意味著革蘭氏陰性菌(大腸桿菌及沙門氏菌)對電漿處理抗性較弱。本研究亦探討了電漿處理對真菌

的效果，使用從仙人掌果汁中分離出來的酵母菌(THU-Y1)，以及從番茄表皮分離出的黴菌作為測試菌，以相同的電漿系統 25kV 處理 3 分鐘，酵母菌(THU-Y1)菌數下降 1.08 \log_{10} 值；黴菌(THU-M1)以 30kV 處理，與無處理比較，培養後，菌絲半徑有明顯所小。



Abstract

Non-thermoelectric energy sterilization processing is an emerging technology, and has the advantages of energy saving and to retain the original quality of the food. This study investigated the bactericidal effect of the two non-thermoelectric energy sterilization systems which is PEF and PLASMA. There are many factors affect the PEF bactericidal effect, including the treatment time, the strength of electric field and the conductivity of sample. This experiment is to use exponential wave as a condition of the pulse, explore the narrow pulse sterilization efficiency. The use of *Escherichia coli* for the determination of the bactericidal effect with different number of sterilization tubes, different voltage spark gap and different media. The results are shown that after treating 20 minutes, the bactericidal effect of eight sterilizing tubes is greater than four sterilizing tubes, the number of bacteria dropped to the value of 0.96 log₁₀. Spark gap in the system changed to 5.5kV, processing after 30 minutes of the sterilization efficiency is greater than the spark gap of 5.0 kV, and the number of bacteria dropped to 1.97 log₁₀ values. Use *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to explore the sterilization resistance between Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. To use water to be conductive media has better bactericidal efficiency than to use medium NB, deal with 30 minutes, the bacterial count decreased to 1.97 log₁₀ value. Also fund that the bacteria count of *Escherichia coli* decreased about 1.22 log₁₀. The factors affecting the plasma sterilization include the voltage of the input system, the processing time and the structure of the bacteria itself.

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* as a sterilizing objects, input voltage 25kV, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* 3 minutes, the decline in the number of bacteria were 3.37, 3.25, 1.99 log₁₀ values; *Salmonella* after 2 minutes, the number of bacteria is decreased to a

value of 3.35 log₁₀. The final testing of the inhibitory effect of the electrical will fungal microorganisms from the cactus juice separated from the yeast (THU-Y1) as the target bacteria to 25kV for three minutes, the number of bacteria fell 1.08 log₁₀ values. The mold (THU-M1) isolated from the tomato epidermis, 30kV plasma treatment, after culture for few days, the activity markedly decreased.



壹、前言

傳統加熱殺菌會破壞食品中熱敏感的機能性成分以及口感，如何有效殺菌並保留食品原有品質，是食品科技研究的重要課題。非熱電能處理是一種新型的加工技術，可用於食品製造及相關行業殺菌處理。此技術在室溫下進行，殺菌所需時間比加熱殺菌時間短，並且無毒性殘存危險。目前脈衝電場(pulsed electric fields; PEF)和電漿(Plasma)兩種非熱電能殺菌技術，可能將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；電漿殺菌的原理是利用電漿與處理槽中的氣體反應所產生的物質，與微生物產生化學作用，破壞細胞導致微生物死亡。

早在1920年代已開始利用脈衝電場處理牛奶中的污染細菌，在總能量150 kJ/kg能達到4.5 log值的殺菌量。目前此一技術日臻成熟，在歐洲和美國已開發商業化的PEF流體殺菌製程，處理效果總括而言，品質優於加熱殺菌處理。關於電漿應用技術，在1968年首次出現了利用氫氣脈衝式RF電漿殺菌的專利。到了1999年，有技術文獻報導，應用電漿殺菌的不同工作氣體，殺菌效率不同，這些工作氣體的殺菌效率確認為 $O_2 > air > CO_2 > H_2 > Ar > N_2$ ；此文獻並發現應用電漿殺菌所需的時間與氣體壓力無關，但是當電漿功率密度增加時則殺菌效率會下降。

為發展國內非電能殺菌技術以期能和國際研發技術接軌，本研究探討常見的食品微生物對脈衝電場及電漿處理的抗性，希望結果可作為來開發非電能殺菌技術的參考。

貳、文獻回顧

一、脈衝電場殺菌

脈衝電場(pulsed electric fields; PEF)是一種非熱處理、無污染、能保持食品原有營養、風味的創新綠色保存技術，與加熱製程比較，耗能小、成本低、設備投資少。基本操作方法是將食品原料放置在通過微量電流產生的脈動電壓電場，適用於流體食品的殺菌處理。目前在美國及歐洲已有商業生產級的牛乳、果汁等流體食品脈衝電場殺菌的設備。

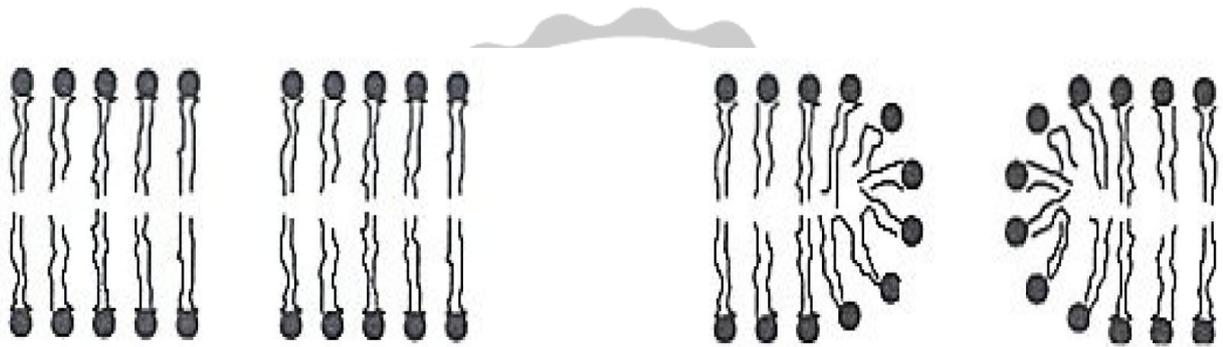
(一) 脈衝電場殺菌作用原理

將食品放置於兩電極片中央，短時間(< 1 sec.)施以一高強度電場(5~70 kV/cm)，破壞食品中的微生物，導致微生物死亡或是造成其產生的酵素失活。

殺菌機制：

(1) 電崩解: 將微生物細胞膜比喻為一電容器，細胞內外充滿電解質，通常細胞膜內外電壓差為 10 mV，對胞膜施加電場，隨著胞外電場能量增加，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，若造成的孔洞太大且拉長孔動持續的時間，則膜的結構會被瓦解，造成不可回復的破壞，導致微生物死亡。

(2) 電穿孔: 對細胞施加電場, 造成胞膜及胞膜上的蛋白質產生暫時性不穩定現象, 圖一, 此現象為電穿孔(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, 造成細胞膜的電導率跟滲透性增加, 胞外溶液滲大量進入細胞內, 使細胞膨脹, 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, 而導致胞膜通透性(Permeability)增大。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。



圖一、細胞膜形成孔洞的示意圖。先形成一個疏水孔洞 (左), 再形成一不可逆轉的親水性孔道。

Figure. 1 Schematic representation of pore formation in a cellular membrane. A hydrophobic pore (left) is formed first, followed by a hydrophilic pore which eventually becomes irreversible. (Chang *et al.*,1992)

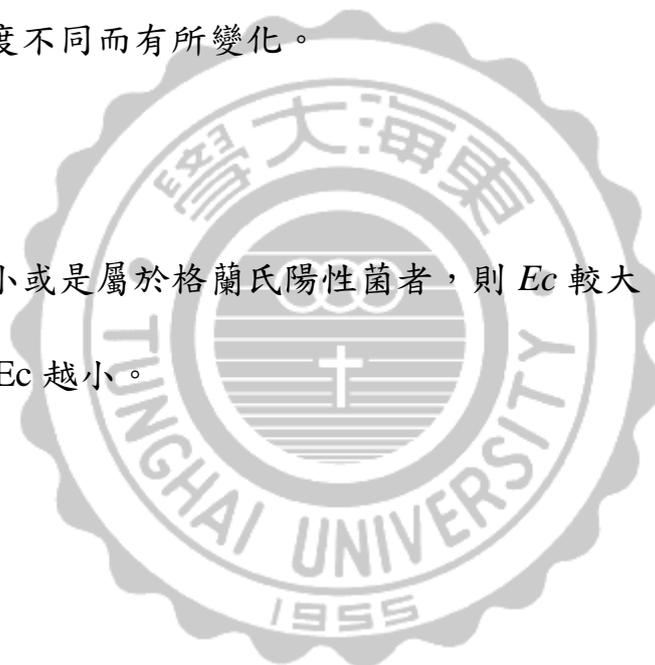
(二) 影響脈衝電場效果之因子

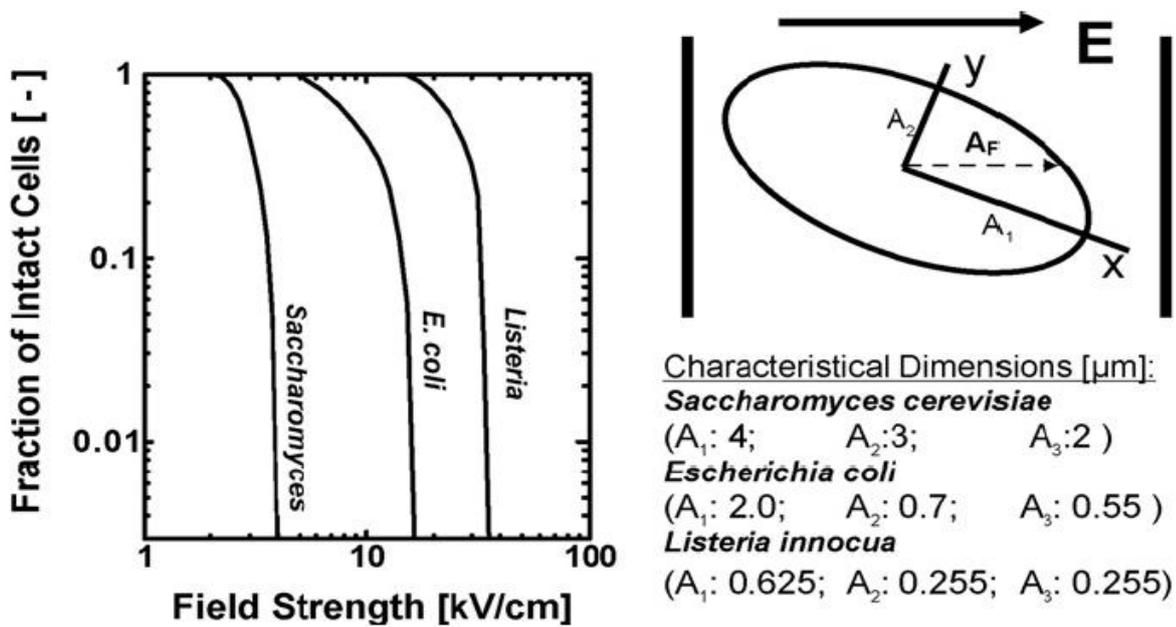
1. 電場強度

PEF 所提供電場強度誘導之膜內外跨膜電壓高於膜內外電位差時，殺菌效果會隨電場強度之增加而增大，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)。此結果呼應電穿孔的理論，微生物胞膜內外兩邊的電位之差異與外加電場成正比， E_c 也會因為微生物細胞大小、細胞壁結構以及脈衝寬度不同而有所變化。

2. 微生物的種類

微生物形態愈小或是屬於格蘭氏陽性菌者，則 E_c 較大，如圖二所示，體積越大的微生物，其 E_c 越小。





圖二、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. 2 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_{crit} . (Toepfl *et al*, 2007)

由於格蘭氏陽性菌與格蘭氏陰性菌細胞壁結構不同，造成兩者對 PEF 的抵抗力也有所不同，雖然格蘭氏陰性菌細胞壁有三層，但三層加起來厚度較薄約 10~15 nm；而格蘭氏陽性菌的細胞壁雖然只有單層，但其厚度約 15~80 nm，高於格蘭氏陰性菌 3~5 倍，所以格蘭氏陽性菌對於物理性質破壞有較高的抵抗力 (Dutrueux *et al.*, 2000; Toepfl *et al.*, 2007)。

文獻指出，菌體的孢子對 PEF 的抵抗力最高，因為孢子結構是由內膜 (inner membrane)、孢子壁 (spore wall) 組成雙層膜，外圍累積胛肽聚醣層，含有內殼 (inner coat)、外殼 (outer coat) 及孢子外壁 (exosporium) 的皮層 (cortex)，可以抵抗高溫、乾燥、化學性滲透及外力所致的物理破壞 (Marquez *et al.*, 1997)。Schoenbach 等人 (1997) 發現孢子的 E_c 值，PEF 脈寬 $> 50 \mu\text{s}$ 時， E_c 為 4.9 kV/cm ，PEF 脈寬 $< 2 \mu\text{s}$ 則 E_c 為 40 kV/cm 。

3. 食品的組成成分

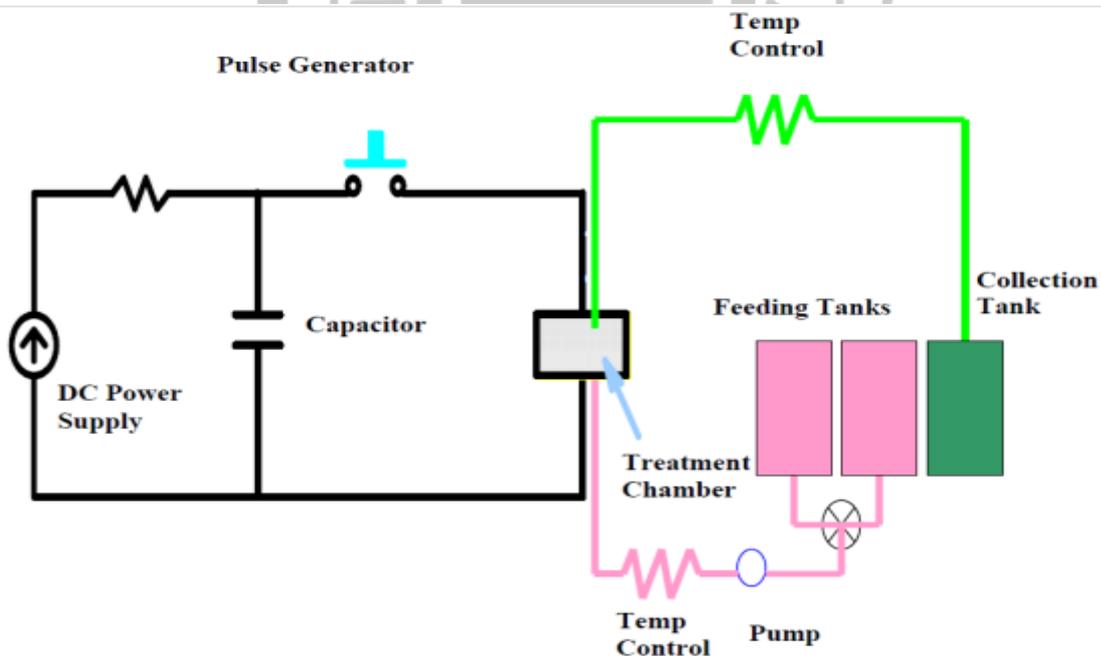
食品的組成成分，會影響 PEF 對食品的殺菌效果，這些成分如脂質、蛋白質，會保護微生物，不因為受到 PEF 處理造成細胞崩解，有文獻提到，奶類食品與果汁類比較，其奶類食品的殺菌效果較差 (Martín-Belloso *et al.*, 1997)。食品的組成成分也會影響食品的導電度進而影響 PEF 的殺菌效果，導電度越大者，食品中離子強度越強，產生較小的電場，殺菌效果較差 (Hülshager *et al.*, 1981; Vega-Mercado *et al.*, 1996)。

食品的 pH 值越小，胞內 H^+ 的增加，進而破壞 DNA 或 ATP 等，使得微生物失活率增大 (Vega-Mercado *et al.*, 1996)。

(三) 脈衝電場設備的基本結構

1. 脈衝電場的系統

PEF 系統由以下部分組成：高壓電源，脈衝控制器，很多個電容，處理槽（靜態或連續），穩壓電極，通過泵浦的循環管線（如果系統是連續的），冷卻或加熱系統，測量設備（電壓，電流和溫度），和 PEF 條件控制器。處理槽彼此由絕緣體分開。每個處理槽有兩個電極，當這些液體通過處理槽的同時也受到 PEF 處理 (Zhang, Q.H. *et.al.*, 1995)。



圖三、脈衝電場系統示意圖。

Figure 3. Schematic Diagram of a Pulsed Electric Field System.

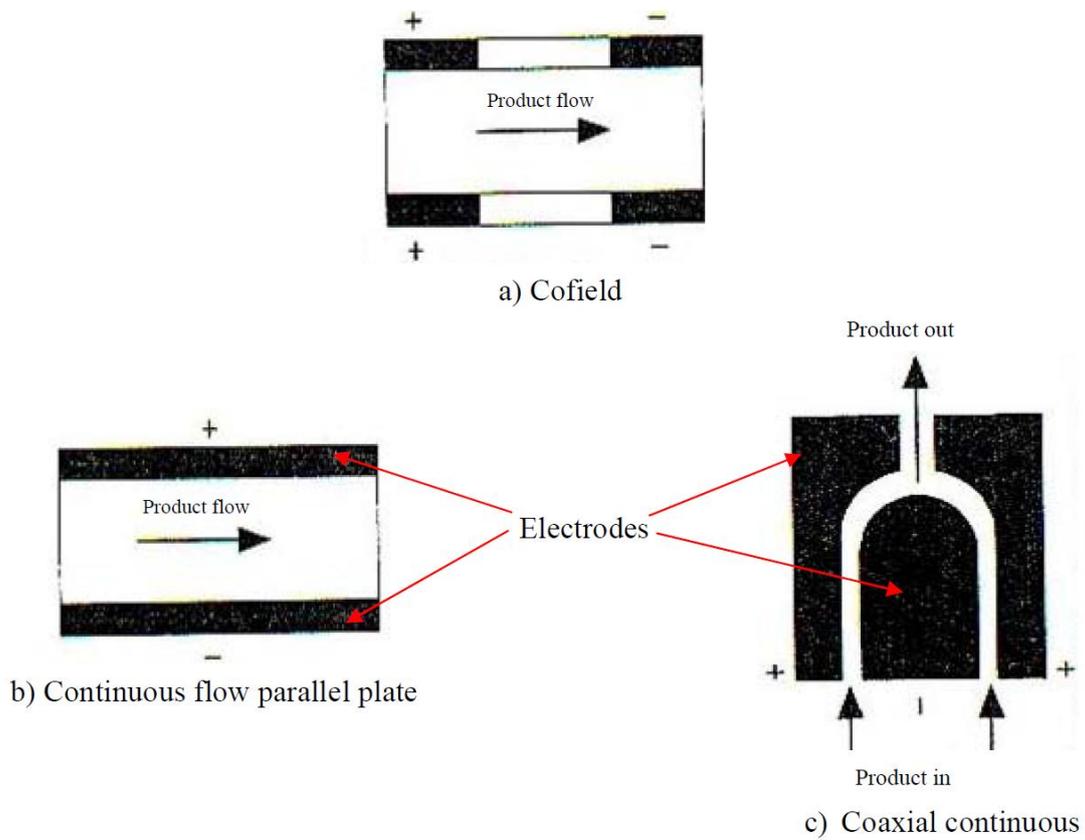
2. 電極(Electrodes)

電極是由惰性材料所組成，如碳、不銹鋼、鈦、黃金、白金或金屬氧化物等，由於電極可能被食品成分所侵蝕，造成沉澱物的形成，所以文獻建議每使用 100 小時換一次電極。處理槽內電極位置的分配。電場強度 (E) 的計算為峰值電壓 (kV) 除以兩電極之間的距離 (cm) (Zhang, Q.H. *et.al.*, 1995)。

3. 處理槽(Treatment chambers)

1987 年科學家設計了一組垂直接動式脈衝處理槽，在兩個不銹鋼電極間，利用絕緣體分開如圖四 a，食品從中間通過進行電場處理，這種設計稱為 cofield。這樣的設計可有效的防止電極被食品的成份腐蝕破壞(Dunn, J.E. *et al.*, 1987)。

1997 年科學家將 cofield 系統加以改裝如圖四 b，使這套系統可以同時處理更多的樣品，而且可以使處理槽內的能量幾乎等於系統所提供的量(閒等人, 1997)。同年也有科學家發展出一同軸處理槽(圖四 c)，液體通過環型圓柱電極，達到脈衝殺菌的效果(Martin-Belloso, O. *et.al.*, 1997)。



圖四、PEF 處理槽。

Figure 4. Diagrammatic representation of the PEF treatment chambers.

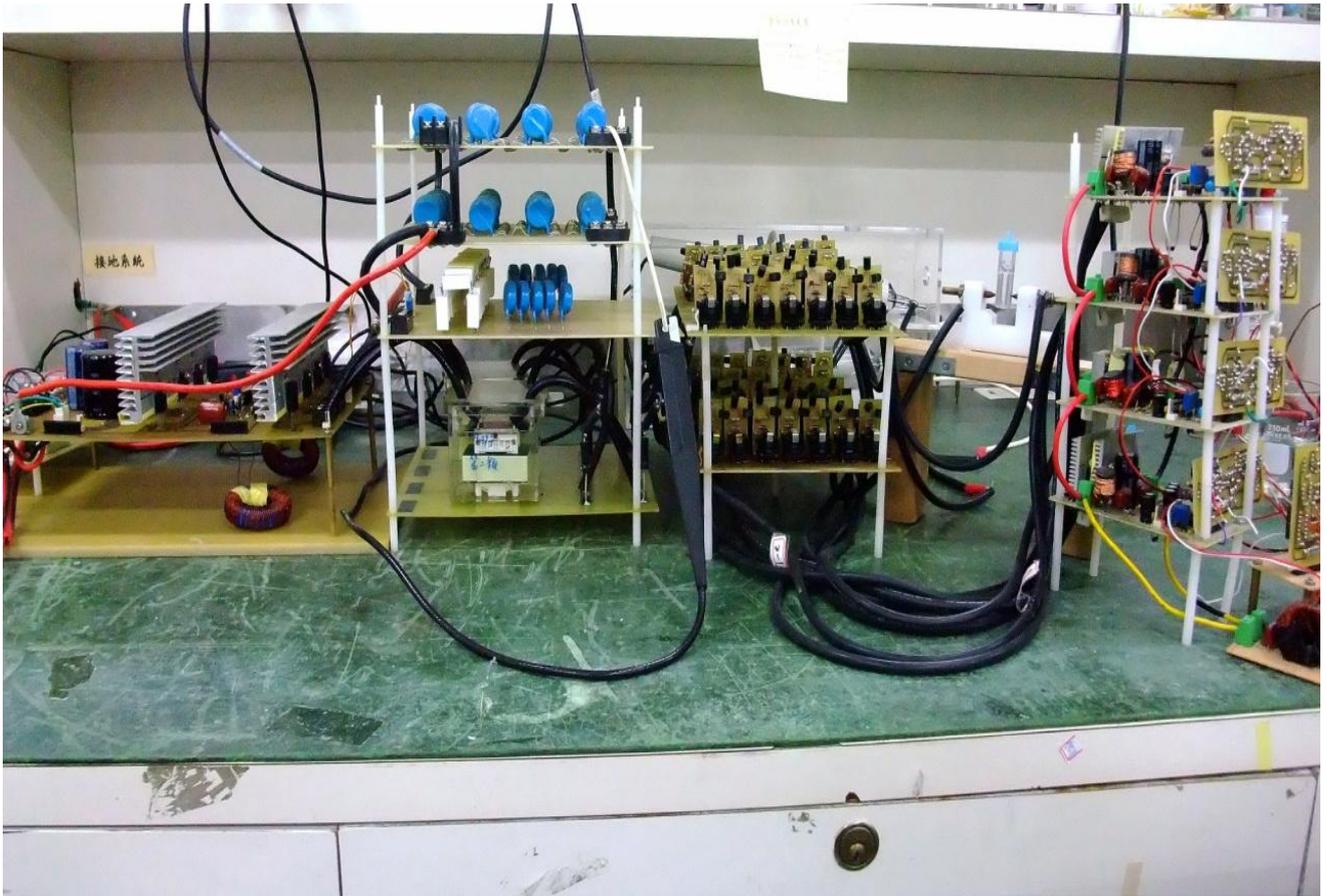
(Takhistov, P. 2006)

4.脈衝產生器 (Pulse generator)

脈衝產生器由高壓電源、電容、電路和放電開關組成，其功能為產生各種波形，如方形波或指數波。能量儲存在電容器內，短時間由放電開關控制將能量釋放到食品中。不同種類的電容器提供了不同能量的儲存。

(四)國內研製的脈衝電場裝置

目前國內長庚大學電機研究所已開發一套批式脈衝殺菌系統及一套流動循環連續式的脈衝殺菌系統。批式脈衝系統可設定脈衝的脈波寬度及電壓強度如圖五。利用這套設備，郭(2005)探討了脈衝電場殺菌對紅肉火龍果和仙人掌果果汁的微生物、色素及感官品質的影響。操作條件設定脈寬 500 ns 的指數波，電場強度 50 kV/cm 處理火龍果中的大腸桿菌 4 分鐘，大腸桿菌的致死率達 3.69 個 log 值。使用 2 μ s 的方形波，強度 25 kV/cm，頻率為 200 Hz 處理 18 秒後，大腸桿菌致死率達 4.46 個 log 值。張(2010) 利用這套設備探討脈寬及電場強度對金黃葡萄球菌、大腸桿菌、及仙人掌桿菌的殺菌效果，結果發現脈寬與電場強度有相乘效果，若使用寬脈波則電場強度可降低；此外以此系統處理諾麗 (*Morinda citrifolia* L.) 果汁中的醋酸菌，設定脈衝寬度 9 μ s，電場強度 13.1 kV/cm，作用時間 0.027 秒，結果可降低菌數 1.37 個 log 值，未達預期效果是由於酸性界質中導電度過大。



圖五、寬脈波 PEF 殺菌系統。

Fig 5. Schematic diagram of wide pulse electric field generator.

(張 2010)

(五) PEF 應用於流體食品殺菌

1920 年代已經有運用電能處理牛奶中的微生物(Calderon-Miranda *et al.*, 1999; Toepfl *et al.*, 2006)。PEF(21.6 kV/cm, 流速 5 l/hour)處理牛奶中的 *Escherichia coli* 和 *Pseudomonas fluorescens*, 在總能量 150kJ/kg 能達到 4.5 個 log 值的殺菌量。2006 年美國商業化的使用 PEF 處理果汁中的微生物, 包括蘋果、草莓及其他果汁, PEF 有顯著的殺菌效果, 達到果汁無須冷藏也可以保存(Clark, 2006)。文獻指出果汁經過熱殺菌處理後, 果汁中的維生素 C 其他風味物質會有流失的現象。四種不同柑橘果汁經 PEF (28 kV/cm、50 pulses) 處理, 果汁的甜度、PH 值、黏度及其他化合物與沒處理過的果汁相比, 沒有明顯的改變(Cserhalmi *et al.*, 2006)。蘋果汁運用 PEF 處理後, 比較不同溫度及能量的 PEF 處理後的殺菌效果, PEF (65°C、34kV/cm) 殺菌效果最為顯著, 有效提升蘋果汁的保存時間 (Heinz *et al.*, 2003)。

二、電漿殺菌

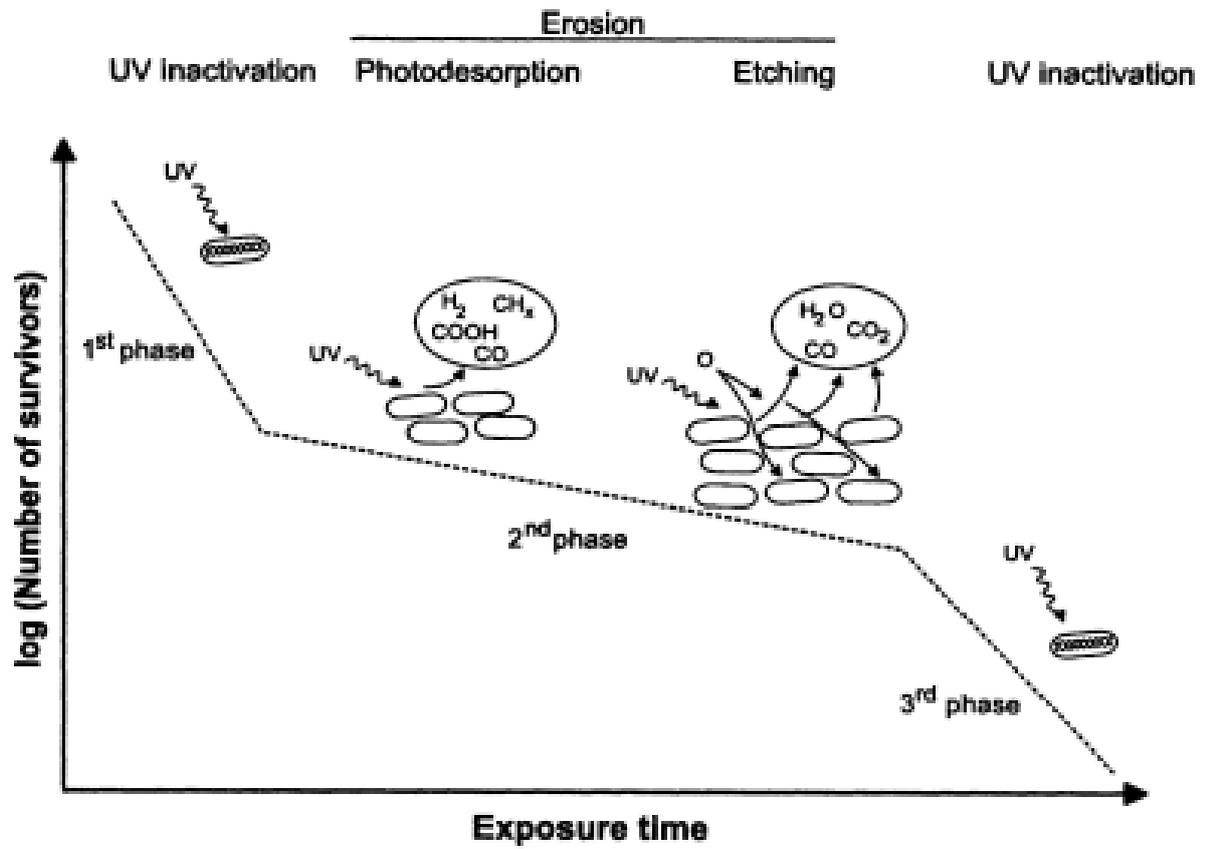
利用電磁場加速氣體中的少量游離電子，撞擊其他原子、激發其至更高能態、產生更多游離電子，如此反覆進行形成穩定低溫的電漿。電漿中含有電子、離子、活性粒子，工業上常用來進行表面改質；近年來發展出的電漿殺菌技術則是利用電漿中的紫外線及活性粒子，所發展出新的電漿應用。

(一)電漿殺菌作用原理(Moisan *et al.*, 2001)：

(A) 紫外線：UV 光照射 DNA 產生 pyrimidine dimers，破壞其 DNA。在紫外線波長 220~270nm 效果最好(詹前朕 *et al.*, 1990)能在 DNA 鍊上造成損傷，達到殺死微生物的效果。

(B) 內部光脫附 (Intrinsic Photodesorption)：UV 光子破壞微生物內的化學鍵結而在微生物體內形成揮發性化合物，如 CO 和 CH_x，此機構也就是俗稱的「光子誘導脫附」 (Photon-induced Desorption)。

(C) 蝕刻 (Etching)：電漿中的反應物與微生物接觸，產生化學反應形成揮發性化合物離開微生物，造成微生物結構的破裂。反應物是由原子和分子基團組成，如 O 和 O₃，或是亞穩態 (Metastable State) 的激發分子，如 ¹O₂。微生物經過蝕刻反應後，產生小分子，如 CO₂ 和 H₂O。UV 光子會增進蝕刻反應，也就是 UV 誘導蝕刻 (UV-induced Etching) 加速殺菌的效率。



圖六、三相殘留曲線與每相的作用機制。

Fig 6. The three-phase residual curve with each phase of the mechanism of action. (Moisan et al., 2002)

(二) 影響電漿殺菌效果之因子

1. 電漿能量的強度

電漿所提供能量誘導處理槽中氣體的進行學化反應，氣體與電漿發生反應後會形成自由基，自由基與菌體發生化學反應，造成菌體破裂死亡。當輸入電壓增加時，電漿的能量就會提高並加速電漿與處理槽內氣體的化學反應，加速殺菌的效果。

2. 處理槽內氣體的種類

電漿殺菌效率會因為處理槽內所使用的氣體不同而有所不同(Soloshenko *et al.*, 1999)，文獻中觀察到殺菌效率為 $O_2 > \text{air} > CO_2 > H_2 > Ar > N_2$ 。UV 光子以電漿環境來控制，當 N_2 與 O_2 進行反應，有可能產生許多激發態分子，其中 $NO\beta$ 最受到研究的矚目，因為 $NO\beta$ 的鍵結 (250-320 nm) 包含著破壞 DNA 效果最為顯著的 220-270 nm 區間(Lerouge *et al.*, 2000a)。

(三) 電漿設備的基本結構

圖七為整體電漿系統的概略圖。

1. 電源供應器 (Power Generator)

產生電漿的能量，通常以電能供給較常被使用。電能為電源供應器提供，分為直流電、交流電及微波放電，放電以電流及電壓量為參數，可分為輝光放電、弧光放電及電暈放電。電漿型態可依電漿操作溫度分為高溫電漿與低溫電漿，表一；高溫電漿主要應用於物質之燃燒裂解，如電漿火炬利用於廢棄物處理，低溫電漿則廣泛應用於半導體製程工業、醫學器具處理或改質及相關工業。

表一、電漿之種類。

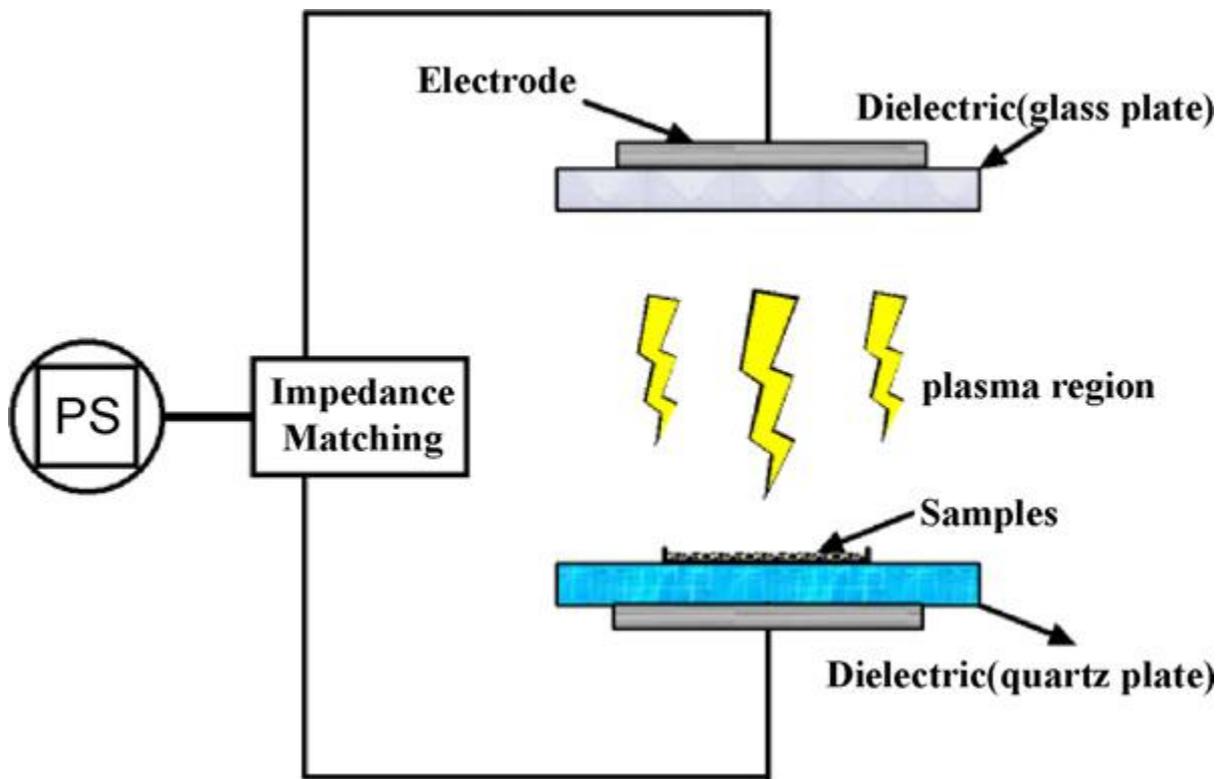
Table1. Plasma species.

	高溫電漿	低溫電漿
氣體溫度	$\sim 10^4$ K	環境溫度
電子溫度	$\sim 10^4$ K	$\sim 10^4$ K
腔體壓力	>100 Torr	<1 Torr
解離度	$\sim 100\%$	$<0.1\%$

(高 2003)

2.處理槽：處理槽包括「反應腔體」及「電極」。反應腔體可區分為鐘罩型、管柱型、十字型、長方柱型等；電極分為平行板型、外部電極型、中空電極等。

3.進氣系統：流量計與流量控制器。其功能為控制通入氣體的種類、流速及通入處理槽氣體的量。



圖七、電漿系統概略圖。

Fig. 7. Schematic diagram of the experimental apparatus.

(Hu Miao 2011)

(四)電漿殺菌

1968 年，Menashi 為第一個利用電漿來進行殺菌的人，其利用氬氣脈衝式 RF 電漿，以線圈纏繞在玻璃瓶外，玻璃瓶內放置水平電線進行殺菌，圖七。將待殺菌物品置入腔體，抽真空至 10~40 mTorr，再充填指定工作氣體至所需壓力 0.05~2 Torr。以 RF 提供功率，電極型式可為線圈或平板在腔體中產生電漿進行殺菌 (Menashi, 1968)。許多實驗以惰性氣體進行殺菌，如 Ar 或 He 等。利用不同工作氣體的殺菌效果，如 Ashman 和 Menashi 試著添加鹵素如 Cl、Br、I 來增加殺菌效果(Ashman *et al.*, 1972)。Boucher 於 1985 年針對某些氣體如 CO₂ 和 Ar 等，在殺菌的效果上去進行討論，發現在孢子的去活化這方面以 CO₂ 較為有效，如果能將孢子在水中預浸泡 1 小時效果會更佳(Boucher, 1985)。1990 年 Ratner 等人發現大多數的氣體都能使用於電漿殺菌，如 O₂、H₂、N₂、H₂O、air、N₂O、H₂O₂、CO₂、SO₂ 等等，前五種氣體是大氣中所含有的(Ratner *et al.*, 1990)。

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。
4. *Salmonella typhimurium* : 購自食品工業發展研究所菌種中心。
5. THU-Y1 : 分離自澎湖科技大學提供之仙人掌果汁中。
6. THU-M1 : 分離自番茄表面。

(二) 藥品及培養

1. 培養基

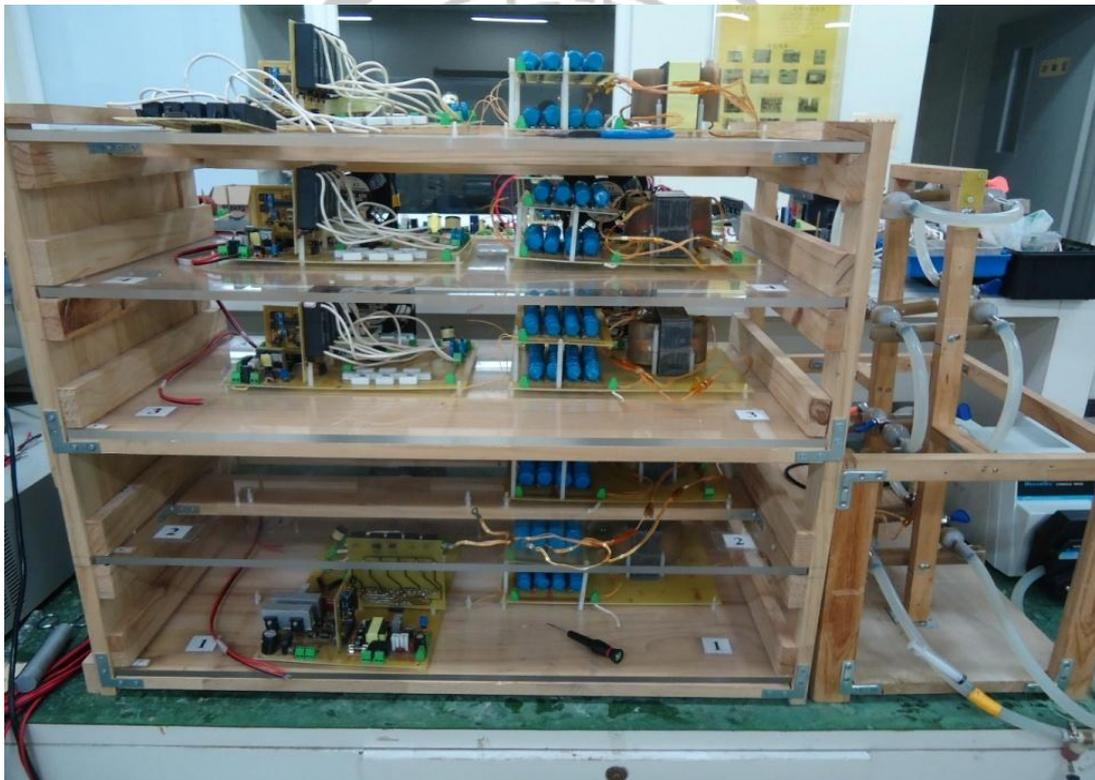
NB (Nutrient Broth) ; PDB (Potato Dextrose Broth); TSB (Tryptic Soy Broth); Agar, Granulated 均購自 Difco 公司

(三) 儀器設備

1. PEF 連續式窄脈波系統

本實驗所使用之 PEF 裝置是由長庚大學電機系裝配，PEF 儀器裝置的電路架構圖與實際儀器架設配置圖，圖八，圖九則為循環系統架構圖，而儀器所使用的波形為指數波（exponential decaying），圖十，該圖譜是由示波儀顯現，其中 C2

是量測電流(A)；Ma.是量測輸出電壓(kV)；橫軸是量測時間。裝置中電路動作原理是將使用市電交流輸入，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，之後經由後極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，利用微處理機控制晶片、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。系統總處理量為 700 毫升，使用蠕動幫浦以每秒 30 毫升的速度將樣品注入循環系統中，循環過程經過殺菌管(圖十三)進行脈衝處理。



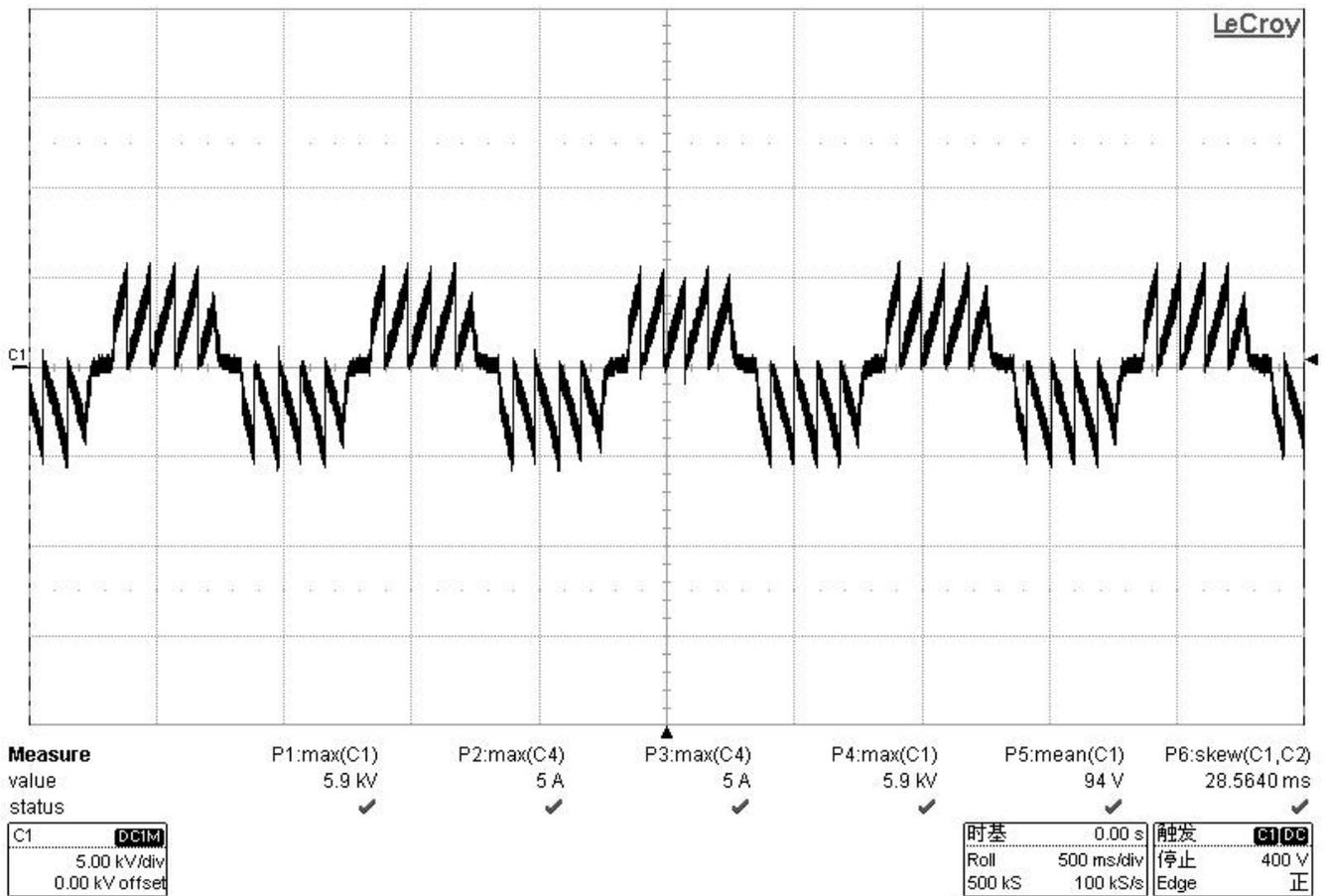
圖八、循環式脈衝電場系統硬體架設及配置圖。

Fig 8. Schematic diagram of circulatory pulse electric field system.



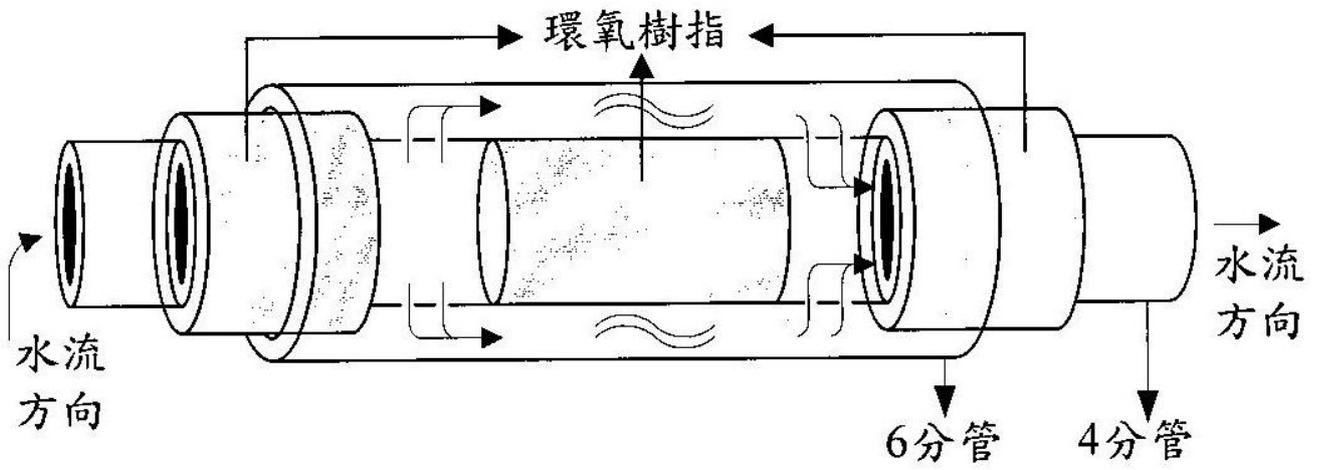
圖九、循環式脈衝電場系統配置圖。

Fig. 9 Schematic diagram of circulatory system.



圖十、系統指數波波形

Fig. 10 Illustration of exponential decaying forms from PEF.



圖十一、電極管的概略圖。

Fig. 11 Schematic diagram of treatment chamber.

2.電漿系統

本實驗所使用之電漿系統是由東海大學徐詮亮老師實驗室提供，系統中氣體及氣瓶購自東洋氣體有限公司，氣體流量控制器(型號 PC-540)購自 Protec 公司，圖十二，供電系統(型號 PC-510)及電漿槽體購自 Extech 公司，圖十三。

3.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) : Nikon P510 Japan

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

烘箱 (Oven) : Risen, Taiwan

無菌操作台 (Laminar flow) : TH320, Taiwan

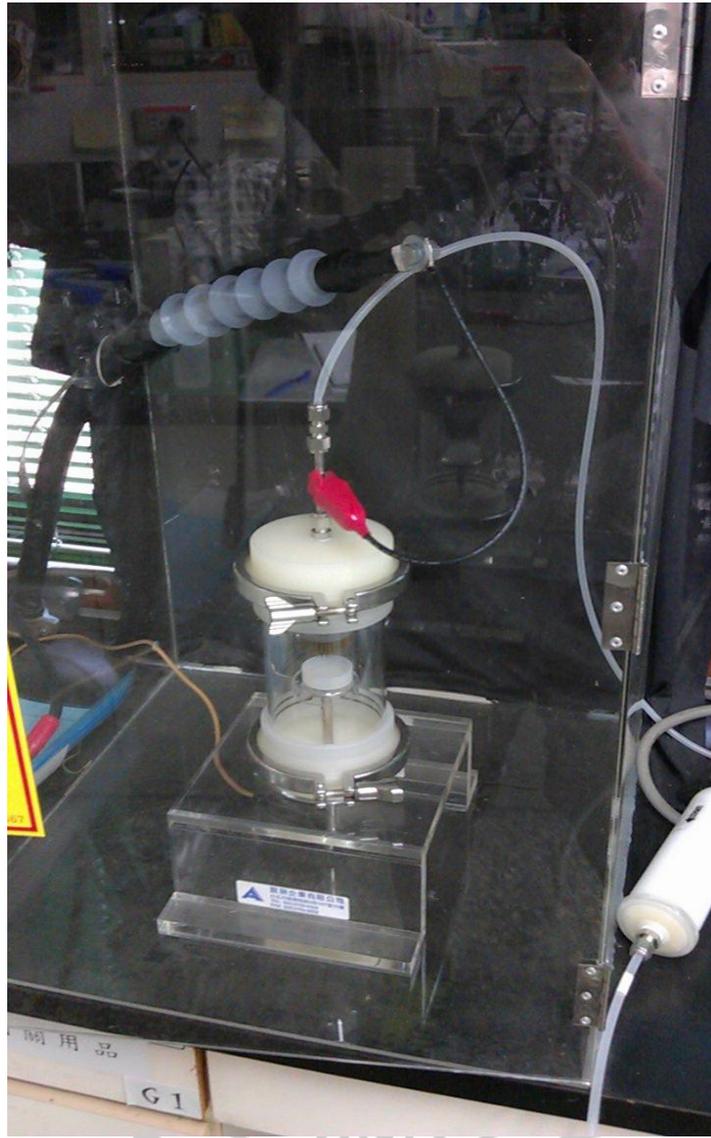
恆溫培養箱 (Incubators) : Sanyo, Japan

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



圖十二，電漿供電系統及氣體流量控制儀。

Fig 12. The generator and gas flow control device of PLASMA.



圖十三，電漿處理槽。

Fig 13. The treatment chamber of PLASMA.

二、實驗方法

(一) 實驗大綱

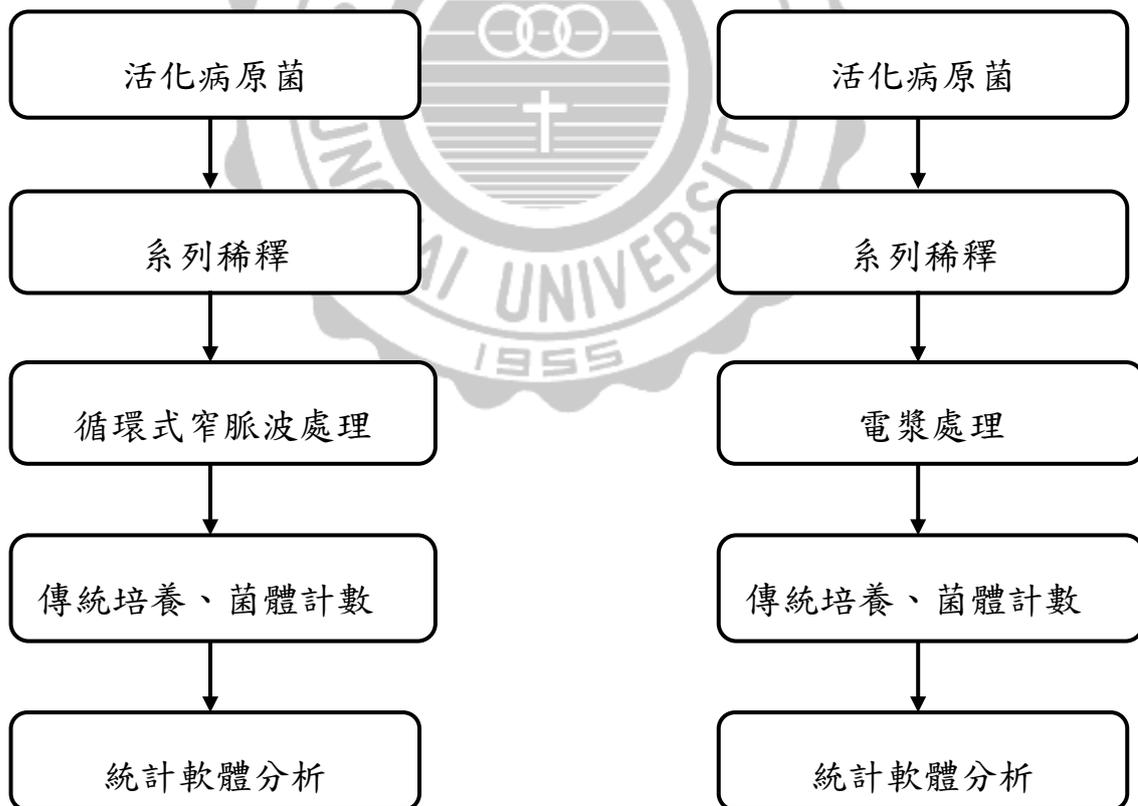
本實驗主要利用常見的食品中毒病原菌為基準，測試長庚電機工程學系自行設計的連續式的脈衝系統及東海大學食科系電漿系統的殺菌效果，紀錄兩系統對食品中毒病原菌的殺菌參數。

(二) 實驗架構

(1) PEF 對食品中毒病原菌的殺菌效果

(2) 電漿對食品中毒病原菌的殺菌效果

果



(三) 培養基之製備

1. 液態培養基

TSB 30 g/L，加熱溶解，取 5 ml 注入試管中，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); PDB (24 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，倒入無菌培養皿中凝固。

3. 菌體活化及菌液製備

Bacillus cereus 10250、*Escherichia coli* 11288、*Staphylococcus aureus* 10779、*Salmonella typhimurium* 自食品工業研究所中購得，THU-Y1 由仙人掌果汁中分離出，接種於 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。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，菌數約為 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml，THU-M1 由發黴的番茄表皮分離出，接種於 PDA 上，25°C 培養。

(四) 測試 PEF 的殺菌效率

1. 不同數量殺菌管對殺菌效果之影響

取 10^3 倍稀釋之菌液(*E. coli*、*S. aureus*)置於四支電擊管及八支電擊管的循環系統中。5 千伏特(kV)電壓通電，處理時間分別在 10min、20min、30min 下。之後菌液經由一連串系列稀釋，取 100 μ l 至 NA 上，以 L 波棒塗抹均勻，置於培養箱中 37°C，培養 18~24 小時，之後再用菌落計數器計算殘存菌數(CFU/ml) (3-1)，計算公式如下，最後再用統計軟體 Sigmaplot 12 做線性分析數據。

$$\text{Colony-Forming Units (CFU/ml)} = \frac{(\text{Number of colonies})/N}{0.1 \times \text{Dilution}^*} \quad (3-1)$$

N: 重複數

0.1: 塗抹法菌液取用量

Dilution*: 稀釋倍數(10^*)

2. 不同電壓的 Spark Gap 對系統的影響

不同電壓電容對系統可提供不同的能量，取 10^3 倍稀釋之菌液通過系統，處理時間分別在 10 min、20 min、30 min，取 100 μ l 塗抹至 NA 上，培養 18~24 小時，計算菌落，最後再用統計軟體 Sigmaplot 12 做線性分析數據。

3. 不同介質對殺菌效果的影響

以 NB 培養基及水作為介值測定脈衝電場的殺菌效果，以導電度計測定其導電度，處理後進行培養，以統計軟體 Sigmaplot 12 做線性分析數據，並比較兩者的差異。

4. 比較革蘭氏陰性及陽性菌對脈衝殺菌的影響

以金黃葡萄球菌作為革蘭氏陽性菌及大腸桿菌作為革蘭氏陰性菌，分別以脈衝電場處理 5、10、15、20、25、30 分鐘，以統計軟體 Sigmaplot 12 做線性分析數據，並比較兩者的差異。



(五) 測試電漿的殺菌效率

1. 探討不同輸入電壓的電漿對病原菌的殺菌效果

取 3 ml 10^3 倍稀釋之菌液(*E. coli*、*S. aureus*、THU-Y1)置於 Plate 中，利用開關組電壓設定，將電漿輸入電壓分別為 15 kV、20 kV、25 kV 處理 10 秒、30 秒、90 秒，以自動螺旋圖抹儀取 50 μ l 置 TSA 上，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，以數菌盤計算菌落數再對照菌數表對應菌數，最後再用統計軟體 Sigmaplot 12 做線性迴歸分析數據。

2. 增加處理時間探討不同微生物對電漿的抗性

取 3 ml 10^3 倍稀釋之菌液(*E. coli*、*S. aureus*、*B. cereus*、*S. typhimurium*)置於 Plate 中，利用開關組電壓設定，將電漿輸入電壓 25kV，大腸桿菌處理 1 分鐘、2 分鐘 2.5 分鐘、3 分鐘，其他菌種則處理 30 秒、60 秒、90 秒 120 秒以自動螺旋圖抹儀取 50 μ l 置 TSA 上，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，以數菌盤計算菌落數再對照菌數表對應菌數，最後再用統計軟體 Sigmaplot 12 做線性迴歸分析數據。

3. 電漿處理番茄表皮上的黴菌

分離番茄上的黴菌，以 PDA 培養 25°C 四天，以打洞器取直徑 1 cm 的菌絲，放於 Plate 上，以不同輸入電壓 30 kV 處理 3 分鐘後，放置於一新的 PDA 上培養 25°C，四天後測量其菌絲的半徑，再以 Sigmaplot 12 做線性迴歸分析數據。

肆、結果與討論

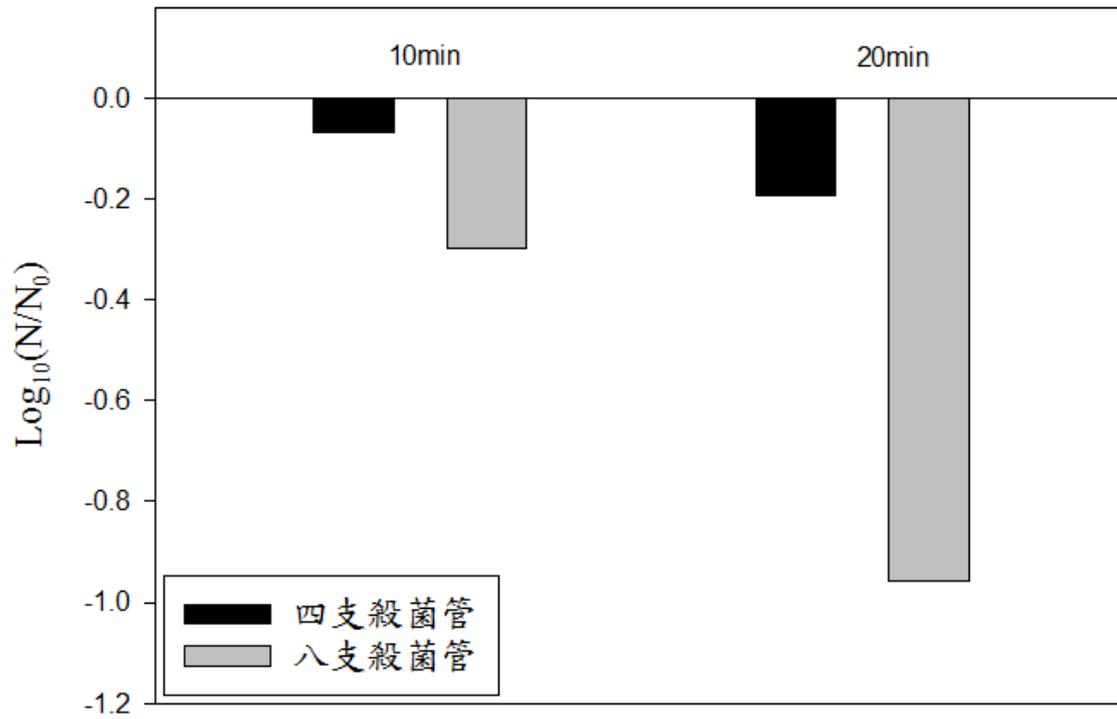
一、PEF 對食品微生物的殺菌效果

本實驗以測試長庚大學電機系自製的連續式窄脈波系統的殺菌效果，分析不同殺菌管數量、不同輸入電壓、不同處理時間及不同處理介質對殺菌效果的影響，最後比較此設備對於大腸桿菌及金黃葡萄球菌的殺菌效力。

(一) PEF 處理條件的測定

1. 殺菌管對殺菌效果之影響

將大腸桿菌系列稀釋，使菌量約在 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml，分別用四支殺菌管及八支殺菌管，施以電場強度處理。將處理完之菌液培養在 NA 上，代入方程式(3-1)換算其殺菌效果。對大腸桿菌而言，在四支殺菌管能量為 3.12 J/cm^3 時，處理二十分鐘，菌數下降 $0.19 \log_{10}$ 值；八支殺菌管能量為 6.24 J/cm^3 時，其菌數下降 $0.96 \log_{10}$ 值，見圖十四。由上述結果顯示 PEF 的殺菌效果會隨殺菌管數量的增加而提高。當脈衝系統中的殺菌管數量越多，樣品中微生物所受到的脈衝次數相對也會變多，對微生物的破壞會增強，所達到的殺菌效果也會越強。

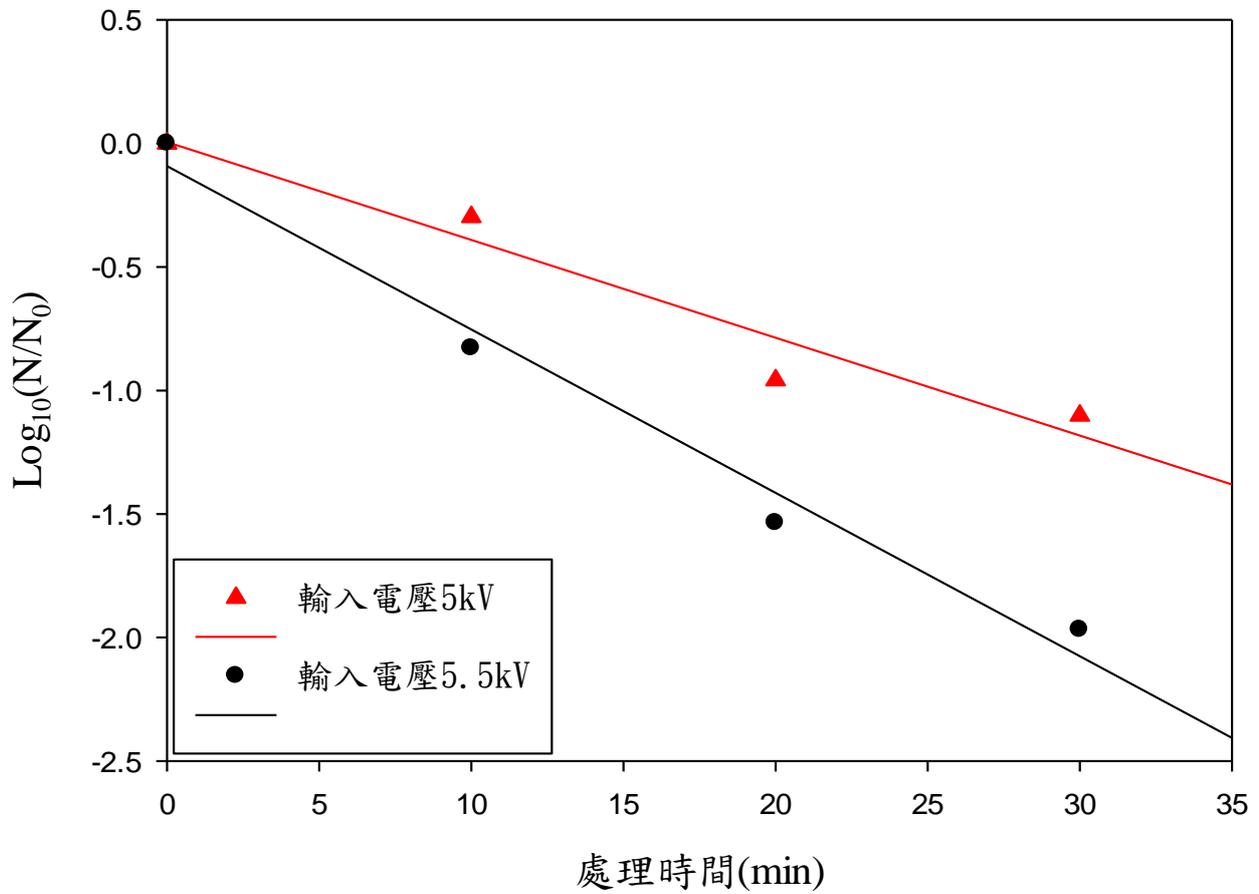


圖十四、殺菌管的殺菌效果。

Fig 14. Effect of PEF chambers on inactivating *E.coli*.

2.放電電容器(Spark Gap)對系統的影響

當系統中的放電電容器可達到的電壓越高，系統所產生的能量就會往上提高，圖十五是使用不同的放電電容器(5 kV 及 5.5 kV)所達到的殺菌效果比較，系統使用 5 kV 的放電電容器，系統預估每發脈衝波的能量可達到 3.13 J，處理三十分鐘，樣品中的大腸桿菌菌數下降了 1.10 log₁₀ 值；使用 5.5 kV 的放電電容器的系統，產生脈衝波的能量預估為 3.78 J，連續處理三十分鐘，樣品中的大腸桿菌菌數下降 1.97 log₁₀ 值。使用放電電容器 5.5 kV 的系統所產生的能量大於放電電容 5 kV 的系統，其殺菌效果也比較強，但是由於系統的結構尚未成熟，所以使用 5.5 kV 的放電電容器容易造成系統當機或是故障，所以之後的實驗依舊使用 5 kV 的放電電容器作為系統的電壓來源。



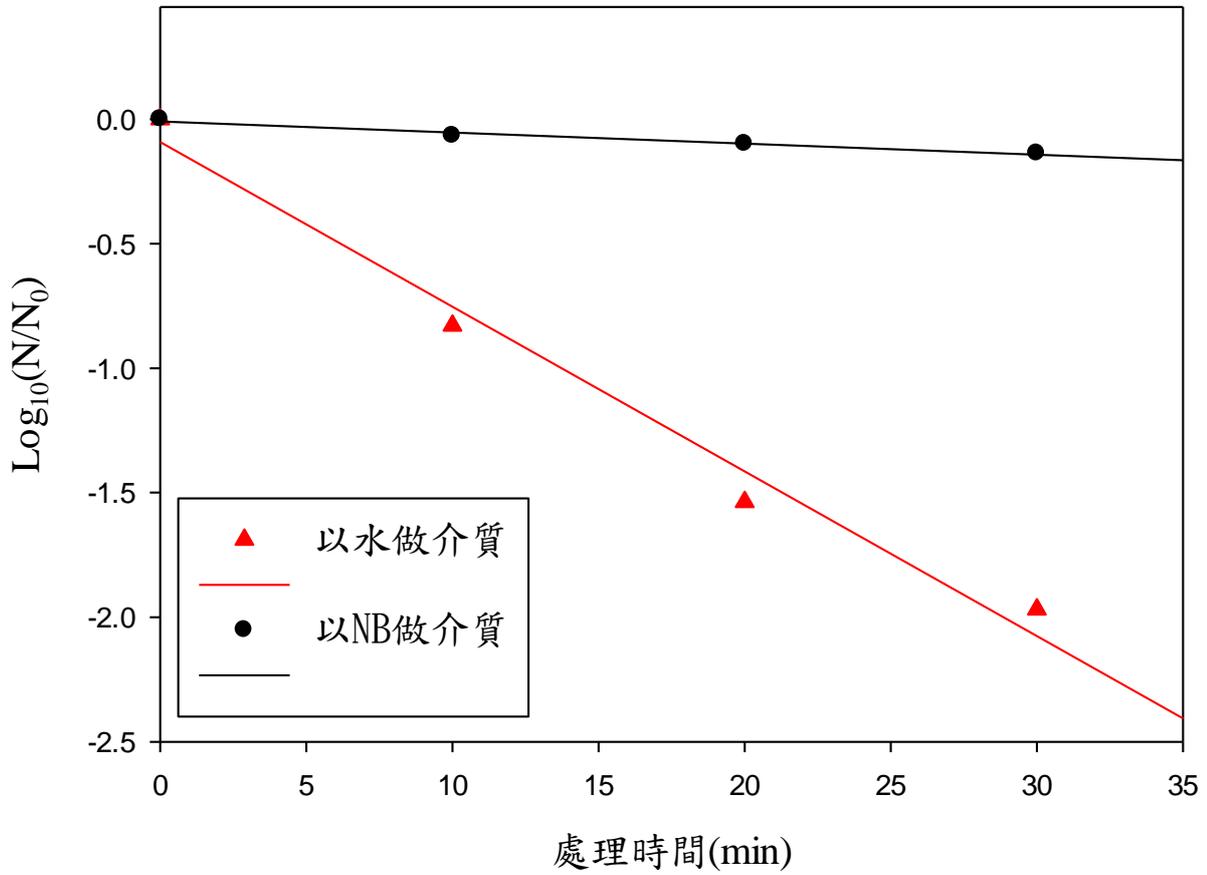
圖十五、使用不同放電電容時，系統的殺菌效果。

Fig 15. Effect of Spark Gap used in circulatory PEF system on inactivating *E.coli*.

3.介質對殺菌效果的影響

使用培養基 NB 及水作為脈衝殺菌的介質，探討不同介質的導電度會不會影響殺菌的效果。

NB 經由測導電度儀測定其導電度為 $1488 \mu\text{s}/\text{cm}$ ，經由處理槽處理三十分鐘後，樣品中大腸桿菌菌數下降 $0.14 \log_{10}$ 值；水的導電度為 $15.44 \mu\text{s}/\text{cm}$ ，處理槽處理三十分鐘後，樣品中大腸桿菌菌數下降 $1.97 \log_{10}$ 值，見圖十六。結果顯示，以水作為本次實驗的介質，殺菌效果遠大於以 NB 作為介質的效果，原因為水的導電度遠小於 NB 的導電度。此結果呼應文獻中所提到的原因，食品中的導電度會影響 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)。



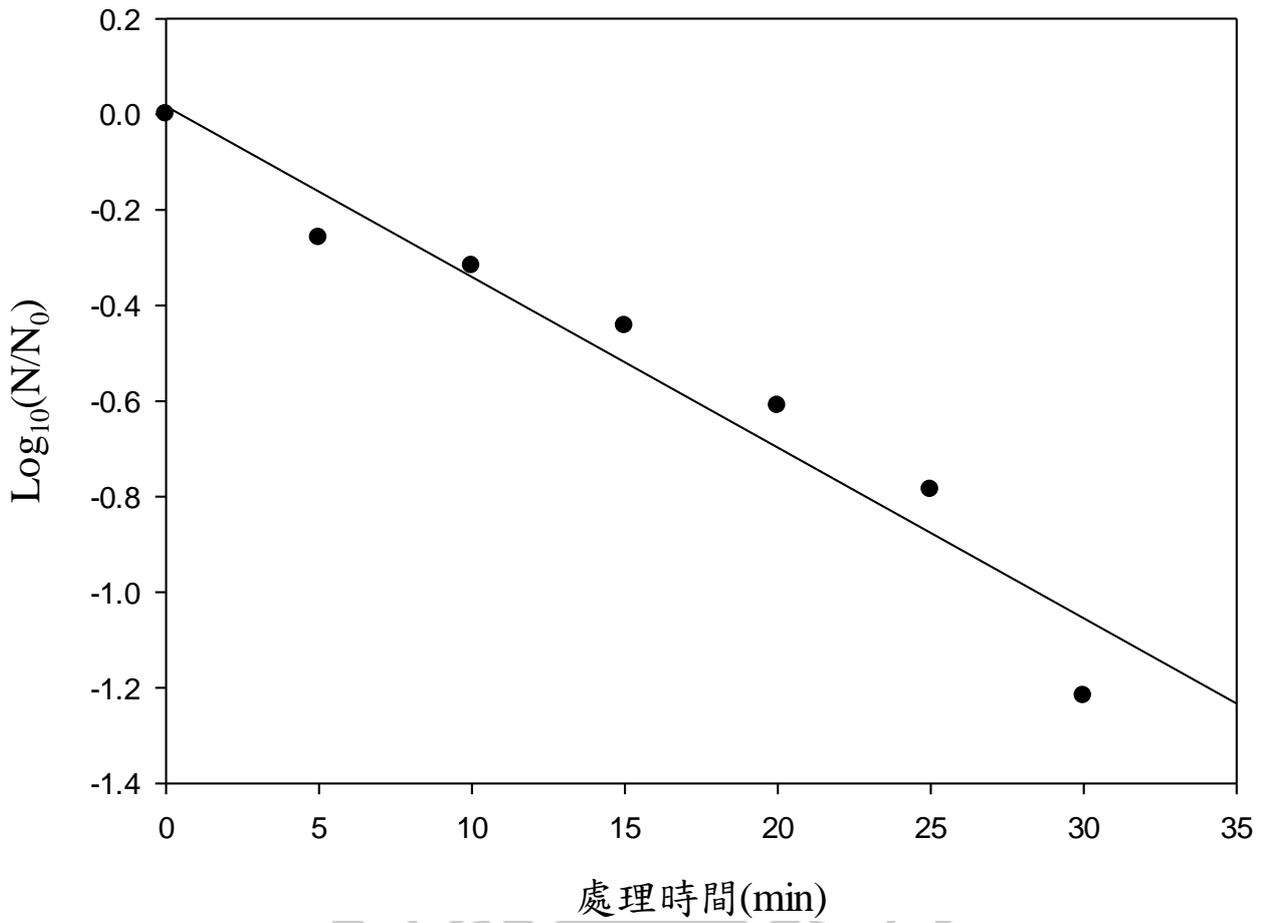
圖十六、不同介質的殺菌效果。

Fig 16. Effect of matrix in circulatory system on inactivating *E.coli*.

(二)循環式脈衝殺菌系統對大腸桿菌及金黃葡萄球菌的殺菌效果

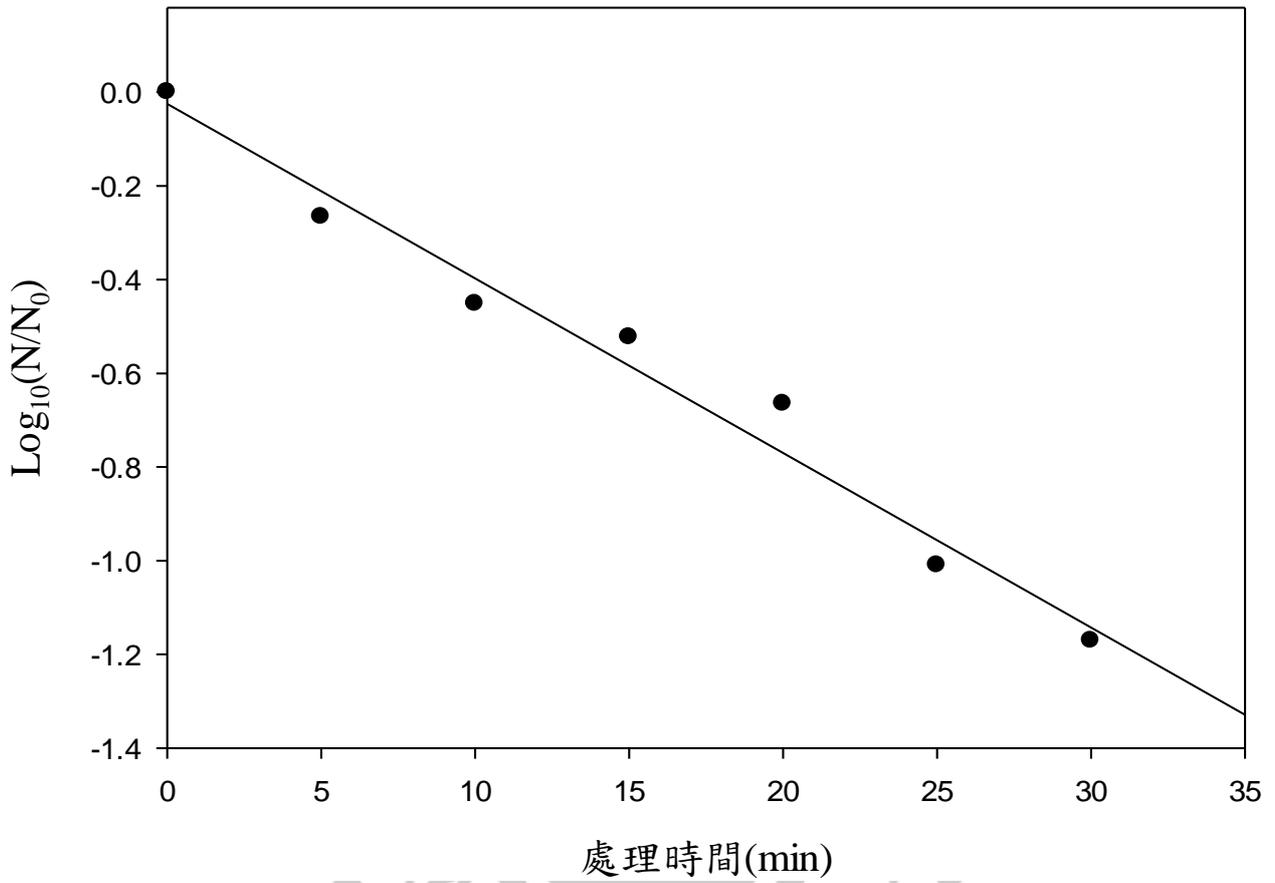
圖十七、圖十八為大腸桿菌及金黃葡萄球菌菌體經過連續式脈充電場處理後的結果，大腸桿菌金黃葡萄球菌的菌數都隨著處理時間的增加而下降。處理三十分鐘，大腸桿菌菌數下降了 $1.22 \log_{10}$ 值，金黃葡萄球菌菌數則下降了 $1.17 \log_{10}$ 值。

與文獻比較，細胞體積愈大會造成 A_F 數值提高，需要較大的臨界電壓才能在細胞膜上產生孔洞。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(Toepfl *et al*, 2007)。



圖十七、循環式脈衝電場對於大腸桿菌的殺菌效果。

Fig 17. Effect of circulatory PEF system on inactivating *E.coli*.

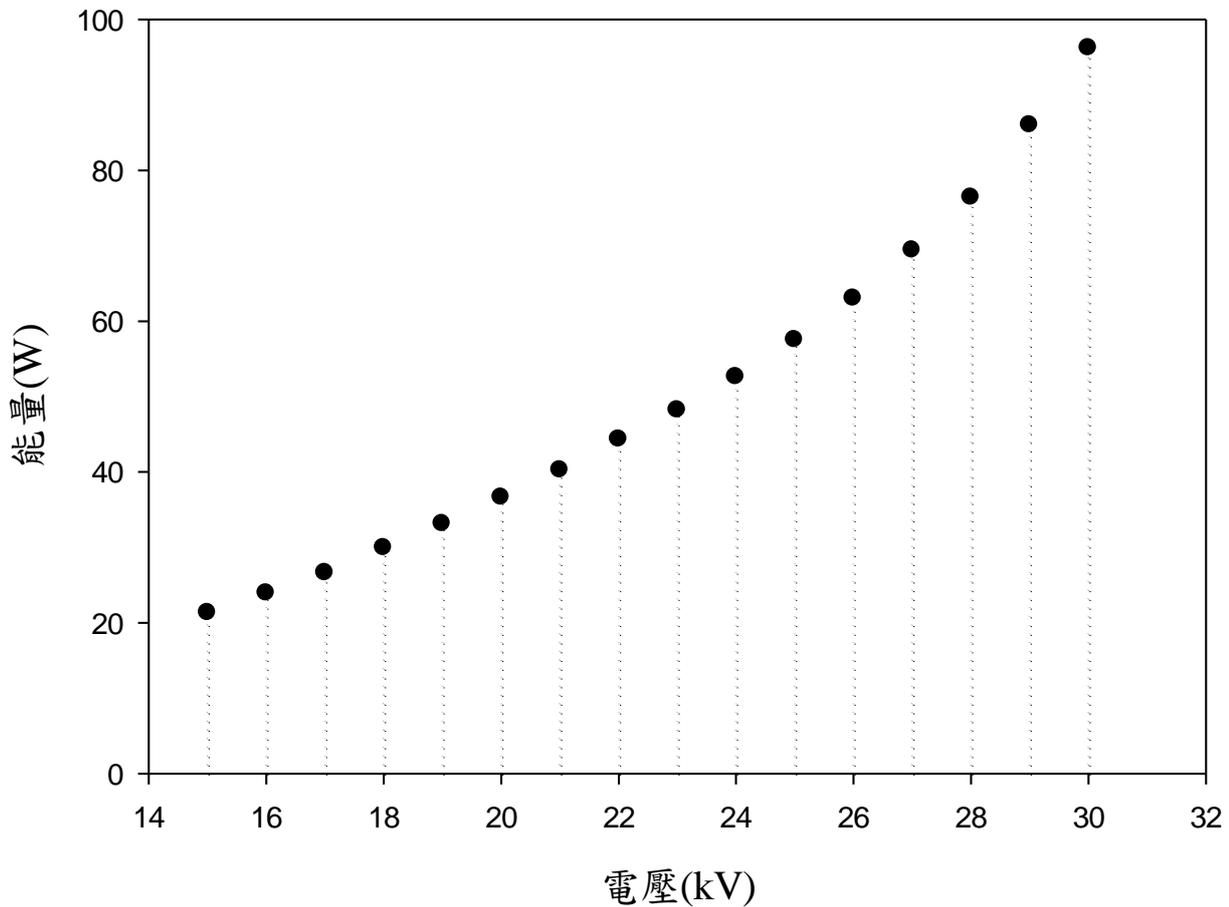


圖十八、循環式脈衝電場對於金黃葡萄球菌的殺菌效果。

Fig 18. Effect of circulatory PEF system on inactivating *Staphylococcus aureus*.

二、電漿對食品中微生物的殺菌效果

利用電漿處理常見食品中毒病原菌包括大腸桿菌、金黃葡萄球菌、仙人掌桿菌及沙門氏菌等，還有從植物分離出的酵母菌和黴菌，探討不同電壓的殺菌效果，找出最有效的殺菌電壓後，探討不同時間的殺菌效果，最後運用系統所提供的能量分析能量對微生物的殺菌效果。本實驗所用的電漿系統所提供的電壓以及其對應的能量(圖十九)。



圖十九、電壓對應能量。

Fig 19. Voltage vs. energy.

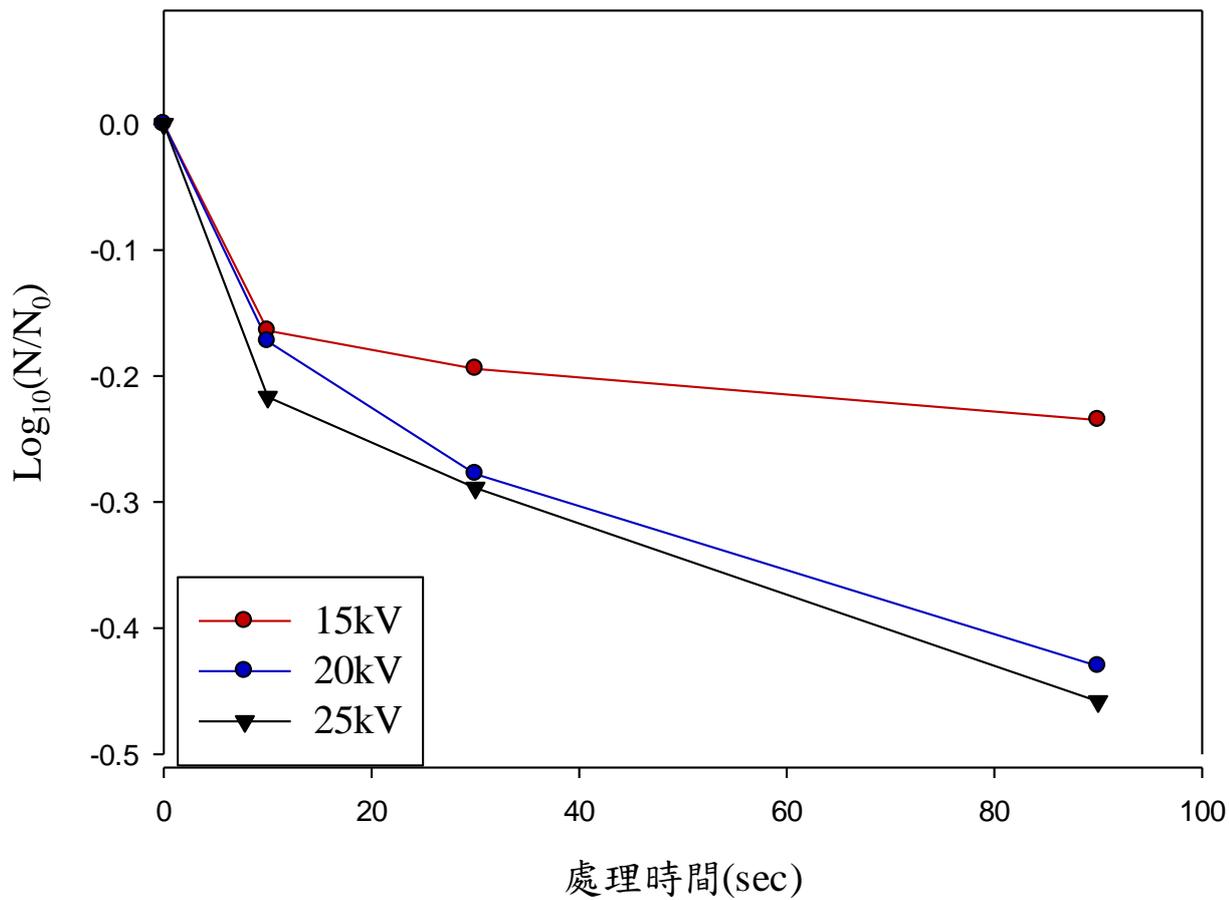
(一)輸入電壓對殺菌效果之影響

大腸桿菌、金黃葡萄球菌、及酵母菌 THU-Y1 經培養後，取約 10^5 菌數的懸浮液 3 ml 置於小培養皿(半徑 1.5cm)中，使用 15、20、25 kV 電壓的電漿處理 10、30、及 90 秒，結果如圖二十、二十一、二十二。

大腸桿菌在三種不同電壓電漿處理下，菌體死滅曲線均有類似的趨勢，經 10 秒處理後，菌數快速下降，15 kV 及 20 kV 的處理，菌數減少接近 $0.2 \log_{10}$ 值；25 kV 的處理，菌數減少超過 $0.2 \log_{10}$ 值。處理 10 秒以後，菌數減少趨緩，推測原因為處理樣品中，懸浮液體表面的微生物與電漿系統所產生的紫外光接觸，使菌數降低，而紫外光的穿透力並不強，所以對於懸浮於液體中的微生物的效果就有所限制。15 kV 的處理，死滅曲線明顯的平緩，可能是低電壓電漿因能量不足，無法持續產生有效的殺菌因子。就整體殺菌效果而言，90 秒處理最大降低菌數，分別是 0.23 、 0.43 、 $0.46 \log_{10}$ 值。

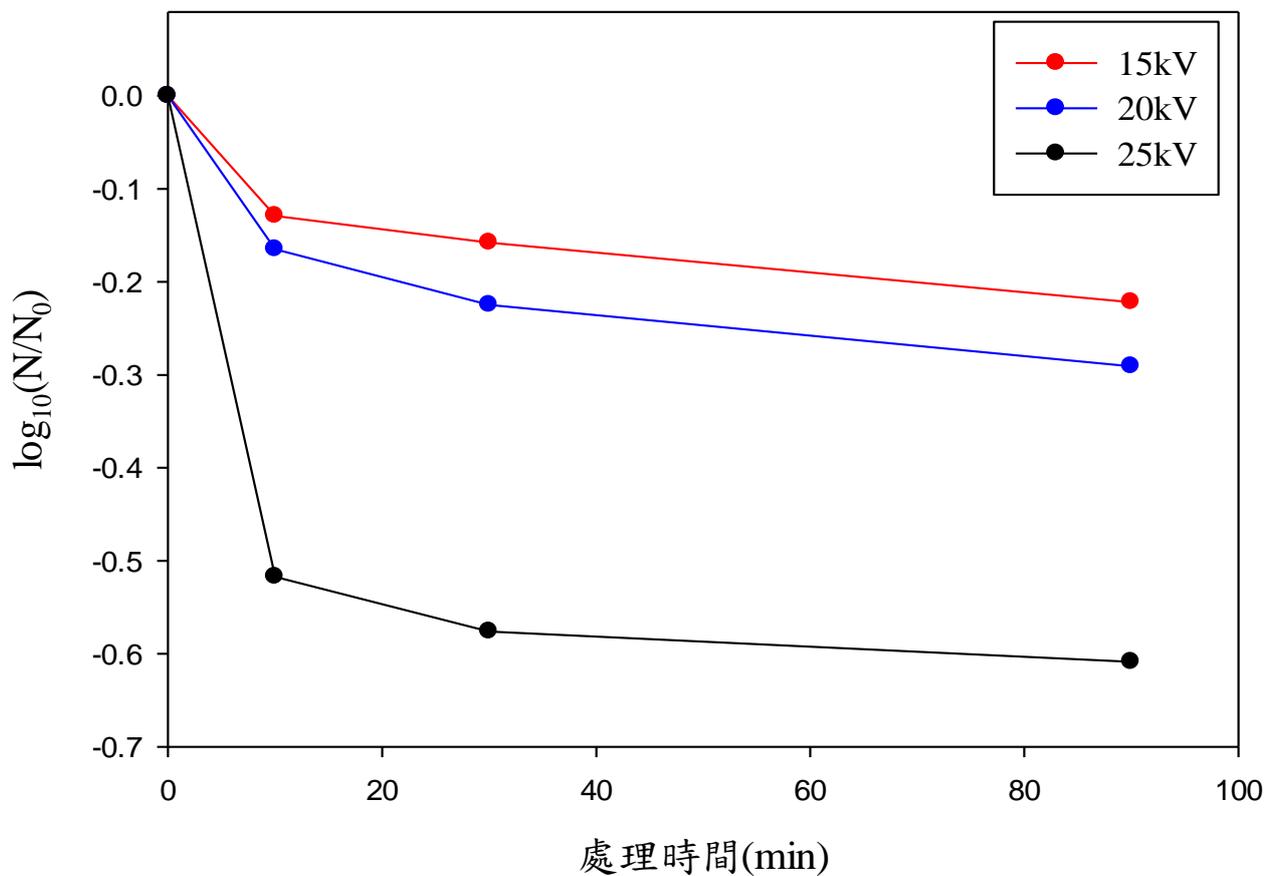
比較圖二十、二十一、二十二，三種微生物在 25 kV 下都達到最大降低菌數，其中金黃葡萄球菌的降低菌數為最大，達到 $0.6 \log_{10}$ 值；THU-Y1 的降的菌數最少，只有約 $0.2 \log_{10}$ 值。

另外，結果顯示三種微生物在 25 kV 下，殺菌效果均達到最大，所以之後的實驗將運用 25 kV 對於不同為生物在不同的處理時間下，電漿殺菌的效果。



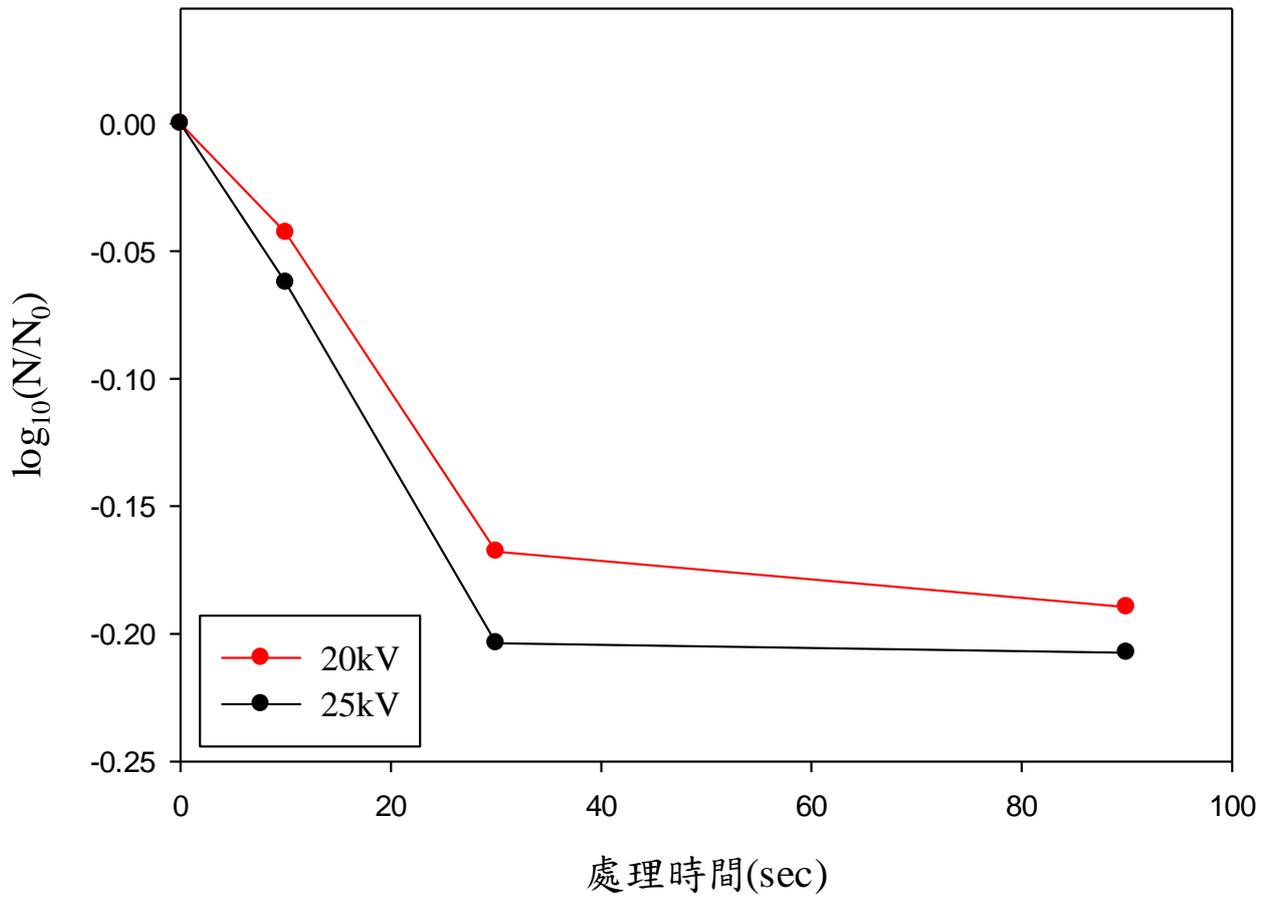
圖二十、不同的輸入電壓(kV)對大腸桿菌的殺菌效力。

Fig. 20 Effect of the input voltage and treating time period on inactivating *Escherichia coli*.



圖二十一、不同的輸入電壓(kV)對金黃葡萄球菌的殺菌效力。

Fig. 21 Effect of the input voltage and treating time period on inactivating *Staphylococcus aureus*.



圖二十二、不同的輸入電壓對 THU-Y1 的殺菌效力。

Fig. 22 Effect of the input voltage and treating time period on inactivating THU-Y1.

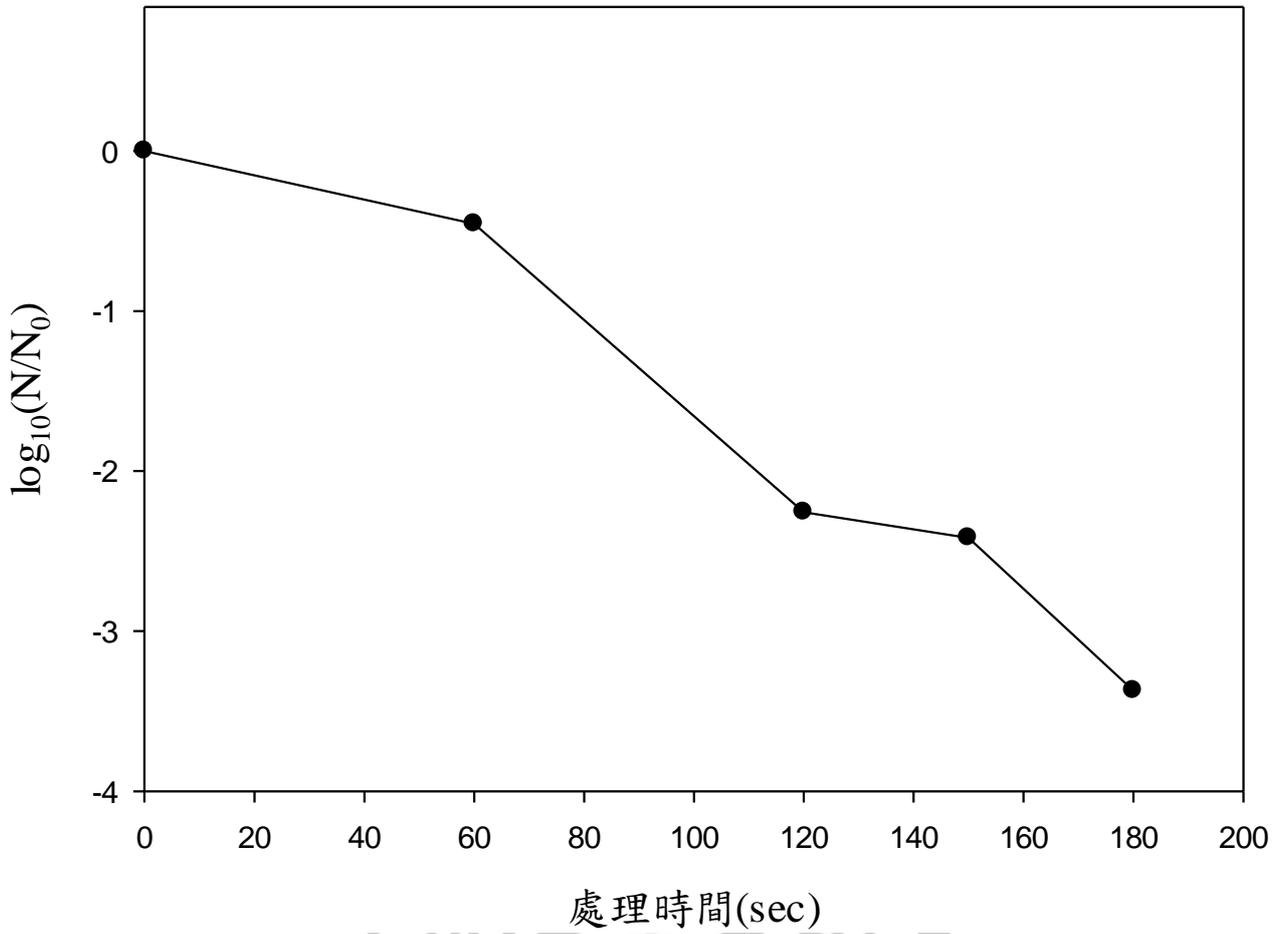
(二) 25kV 電漿殺菌效果

根據前實驗的結果，出入電壓 25 kV 時有明顯的殺菌效果，而且當樣品為液態樣品時，輸入電壓超過 25 kV，電漿系統會產生短路。

所以輸入電壓固定在 25 kV，增加處理時間及處理的菌種。以大腸桿菌、金黃葡萄球菌、THU-Y1、沙門氏菌及仙人掌桿菌系列稀釋至 $10^5\sim 10^6$ CFU/ml，進行電漿處理，探討電漿對於病原菌的殺菌效果。

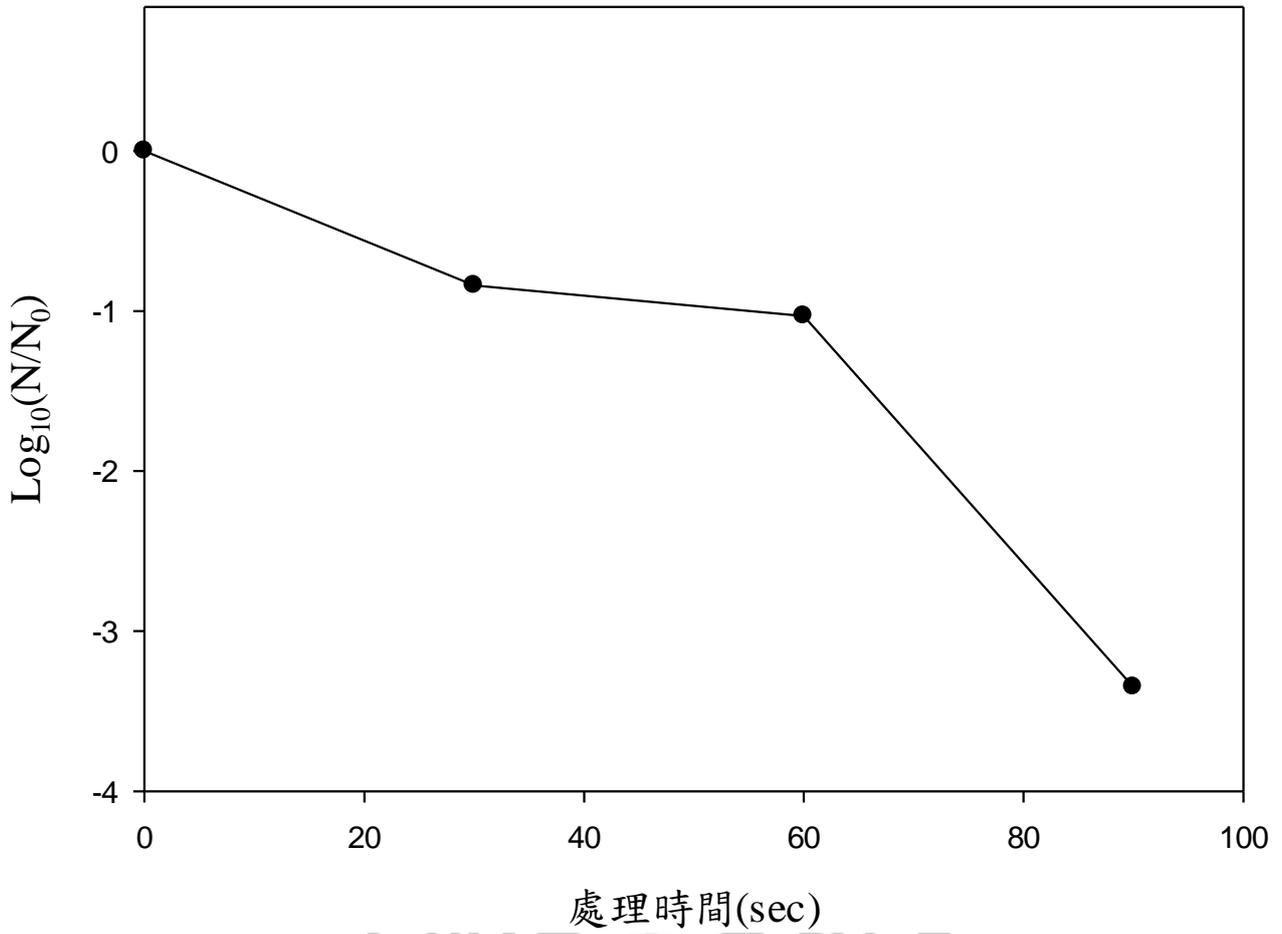
大腸桿菌處理 180 秒，降低菌數 $3.37 \log_{10}$ 值(圖二十三)；沙門氏菌處理 90 秒，降低菌數為 $3.35 \log_{10}$ 值(圖二十四)，繼續處理到 120 秒時，培養基上的菌落會少於 2 位數，所以不可計算；金黃葡萄球菌處理 120 秒的效果，降低菌數為 $3.25 \log_{10}$ 值(圖二十五)；仙人掌桿菌處理 120 秒，降低菌數為 $1.99 \log_{10}$ 值(圖二十六)；酵母菌 THU-Y1 處理 180 秒，菌數下降 $1.08 \log_{10}$ 值(圖二十七)。

除此之外，由圖二十三、圖二十四及圖二十七可以發現大腸桿菌、沙門氏菌及 THU-Y1 的殘留曲線成一階梯狀，而圖二十五、圖二十六發現金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌的降低曲線為一對數下降的曲線。推測原因，因為微生物的結構不同造影響了殺菌的效果。



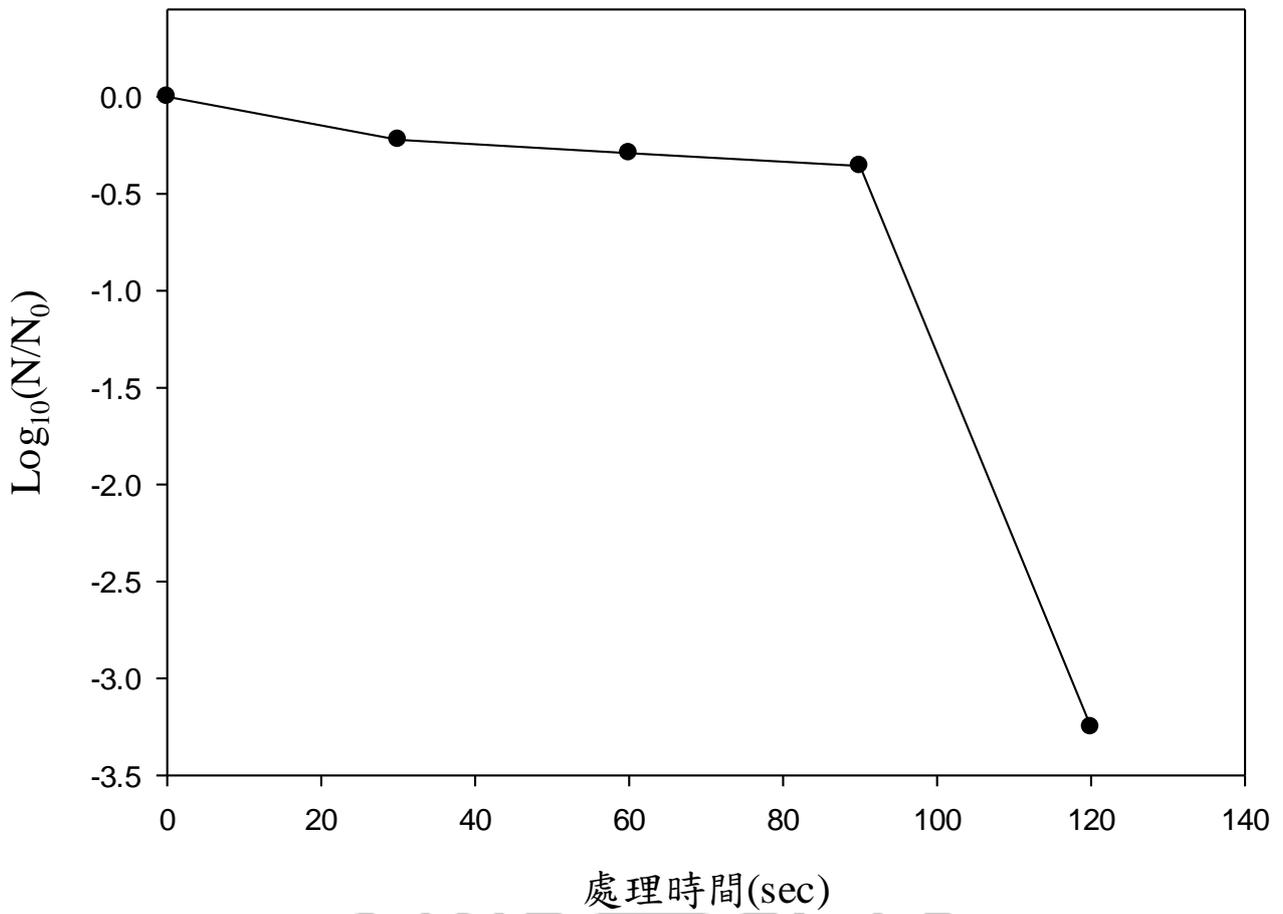
圖二十三、不同處理時間對大腸桿菌的殺菌效力。

Fig. 23 Effect of the input voltage (kV) on the inactivation of *E.coli* under various treatment times.



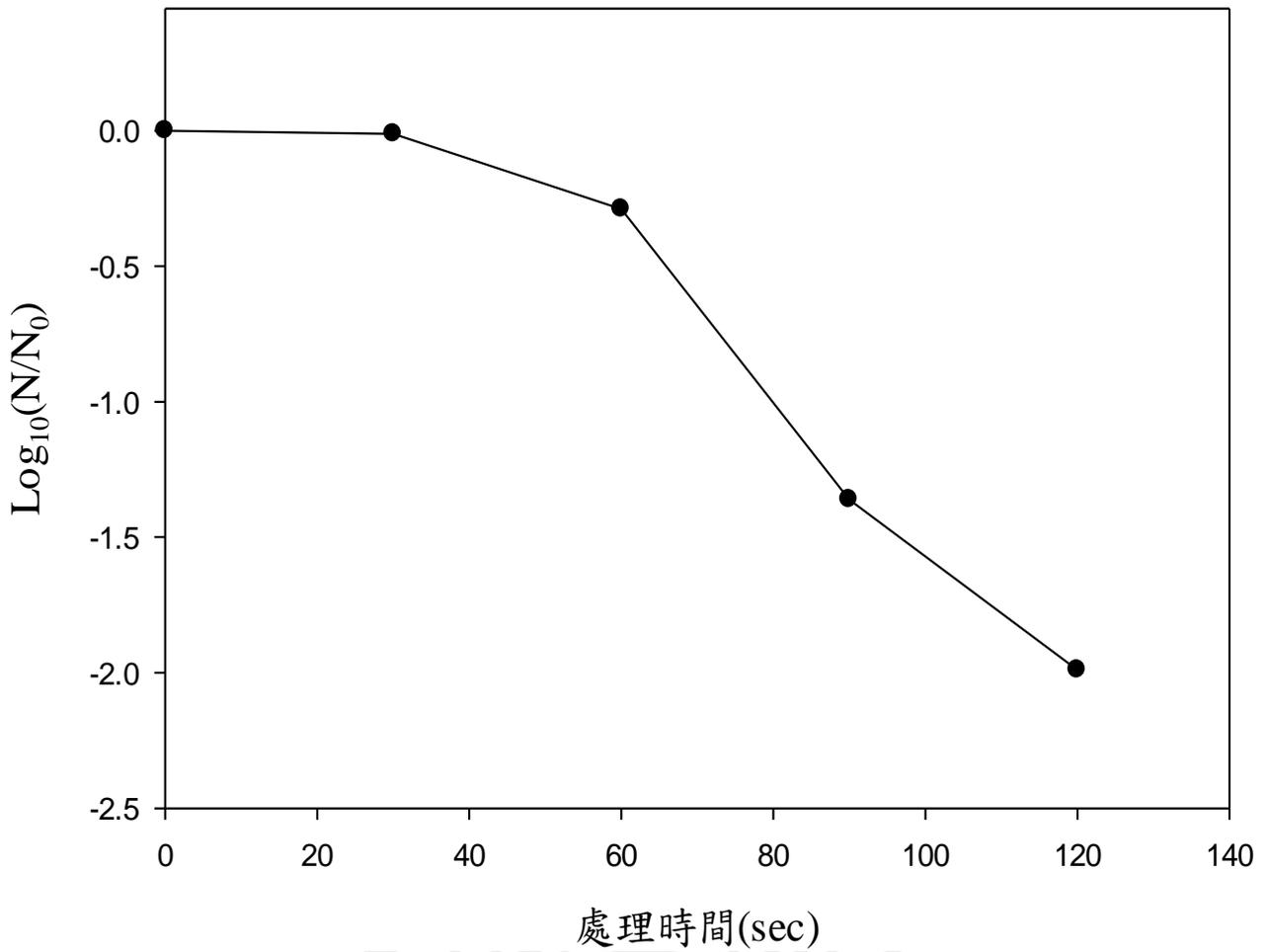
圖二十四、不同的處理時間對沙門氏菌的殺菌效力。

Fig. 24 Effect of the input voltage (kV) on the inactivation of *Salmonella typhimurium* under various treatment times.



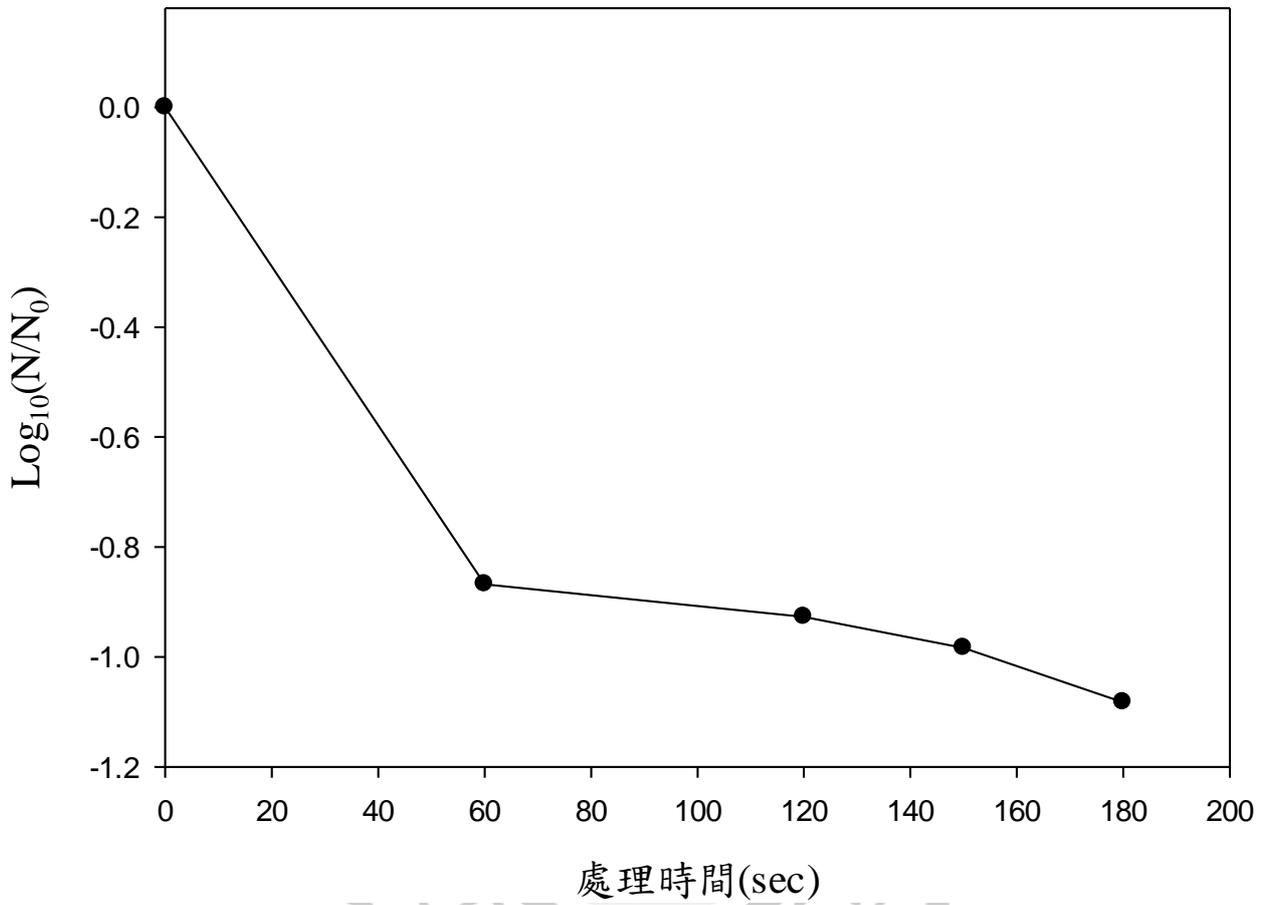
圖二十五、不同的處理時間對金黃葡萄球菌的殺菌效力。

Fig. 25 Effect of the input voltage (kV) on the inactivation of *Staphylococcus aureus* under various treatment times.



圖二十六、比較不同處理時間對仙人掌桿菌的殺菌效力。

Fig. 26 Effect of the input voltage (kV) on the inactivation of *Bacillus cereus* under various treatment times.



圖二十七、不同的處理時間對 THU-Y1 的殺菌效力。

Fig. 27 Effect of the input voltage (kV) on the inactivation of THU-Y1 under various treatment times.

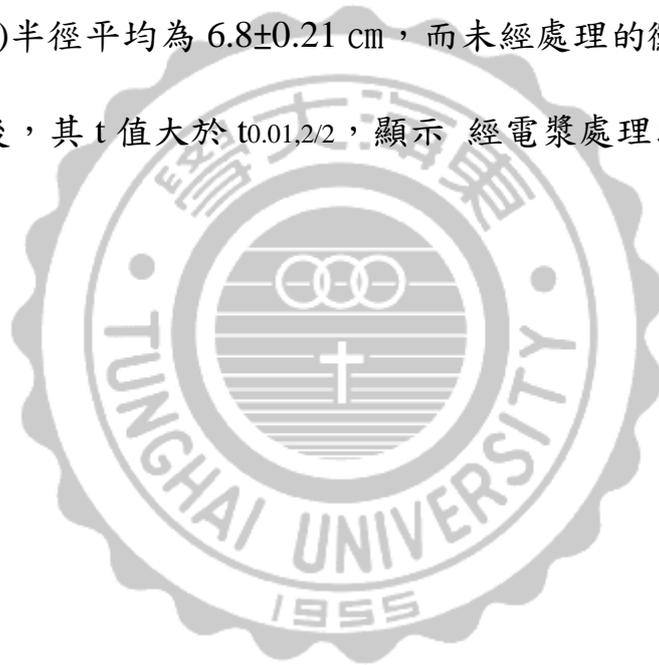
大腸桿菌及沙門氏菌為格蘭氏陰性菌，金黃葡萄球菌及仙人掌桿菌為格蘭氏陽性菌，THU-Y1 則為一酵母菌。格蘭氏陰性菌與格蘭氏陽性菌因為其外部結構不同，導致殺菌的效果也有所不同。陰性菌的細胞壁雖然較薄，但其構造較為複雜，細胞壁外有一層脂質層，且細胞壁是由外膜及膠質所組成，細胞壁內為原生質膜；格蘭氏陽性菌則為膠質細胞壁及原生質膜構成，雖然格蘭氏陽性菌的細胞壁較厚，但結構較為簡單。酵母菌細胞壁的最裡層是由葡聚糖的細纖維組成，它構成了細胞壁的剛性骨架，使細胞具有一定的形狀，覆蓋在細纖維上面的是一層糖蛋白，最外層是甘露聚糖，由 1,6-磷酸二酯鍵共價連接，形成網狀結構。

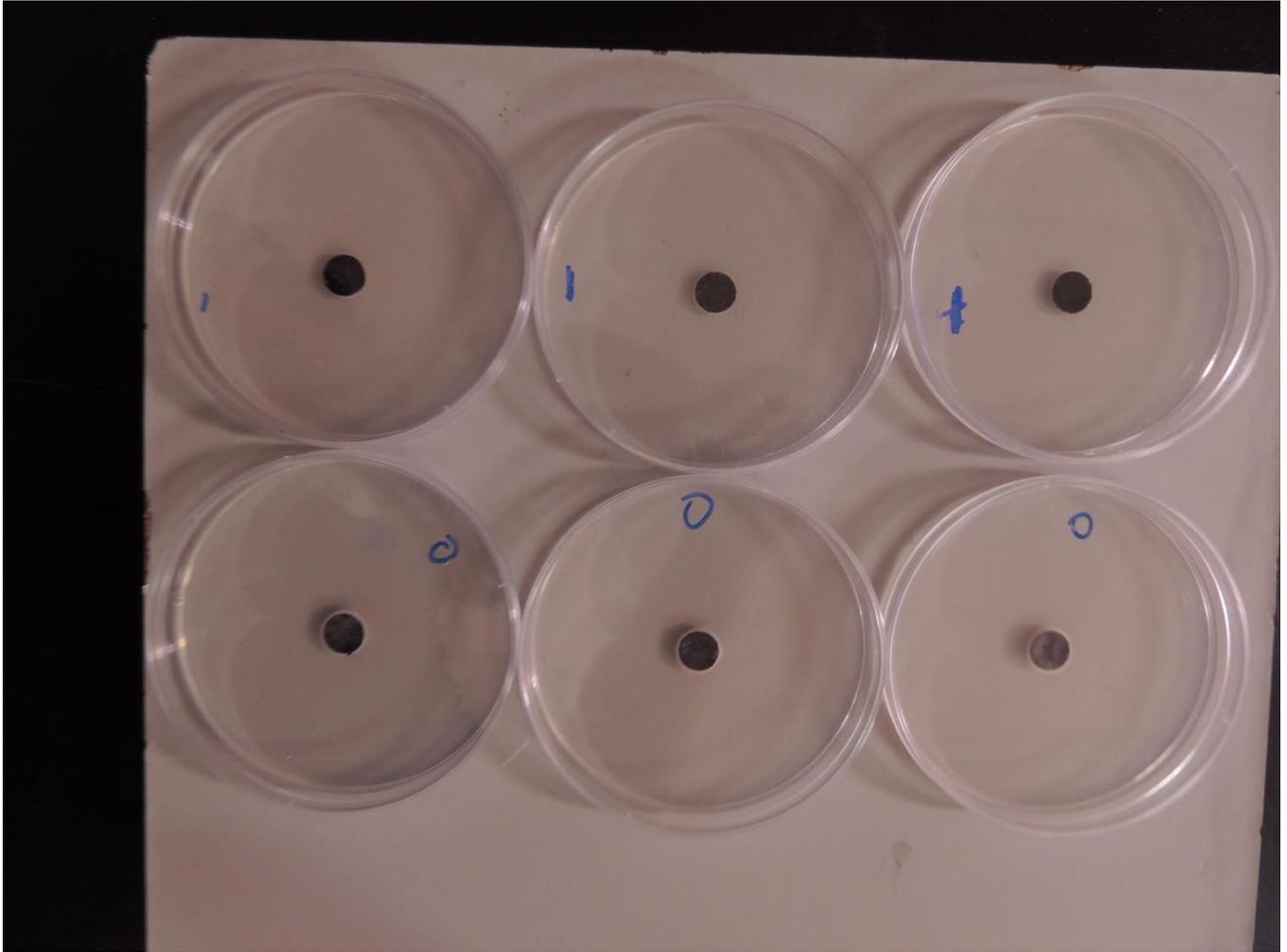
電漿是利用化學方式破壞細胞，當電漿與外在物質產生的化合物與微生物接觸時，微生物細胞壁是對電漿的第一道防線，因此構造不同會影響電漿對微生物的致死率，當構造越複雜，對於電漿的殺菌抗性就越高。

格蘭氏陰性菌所表現出的殘留曲線可呼應文獻中電漿殺菌包含三種殺菌機制(Moisan et al., 2002)，其中在第二相中佔有主要影響地位的兩個機制，分別為機制 B 的 UV 光內部光脫附作用和機制 C 的電漿蝕刻反應，由於都是以原子的形式侵蝕微生物，因此皆具有侵蝕的效果。

(三)利用電漿處理番茄腐敗菌

番茄表面分離出的黴菌經過 30 kV 電漿處理後培養，標記 0 為處理前，標記 1 為經過處理。圖二十八、圖二十九、圖三十分別為處理後第一天、第二天、第三天，經觀察，有電漿處理的黴菌菌絲密度均比未經電漿處理的菌絲密度低，推估電漿可能可以降低黴菌的活性。而圖三十一為電漿處理後培養十天的結果，經過電漿處理的黴菌菌絲密度都比較低，圖三十二則為處理十天後培養基的反面，經過處理的黴菌(左)半徑平均為 6.8 ± 0.21 cm，而未經處理的黴菌(右)半徑平均為 7.4 ± 0.17 cm，統計後，其 t 值大於 $t_{0.01,2/2}$ ，顯示 經電漿處理以後，黴菌的活性有明顯下降。





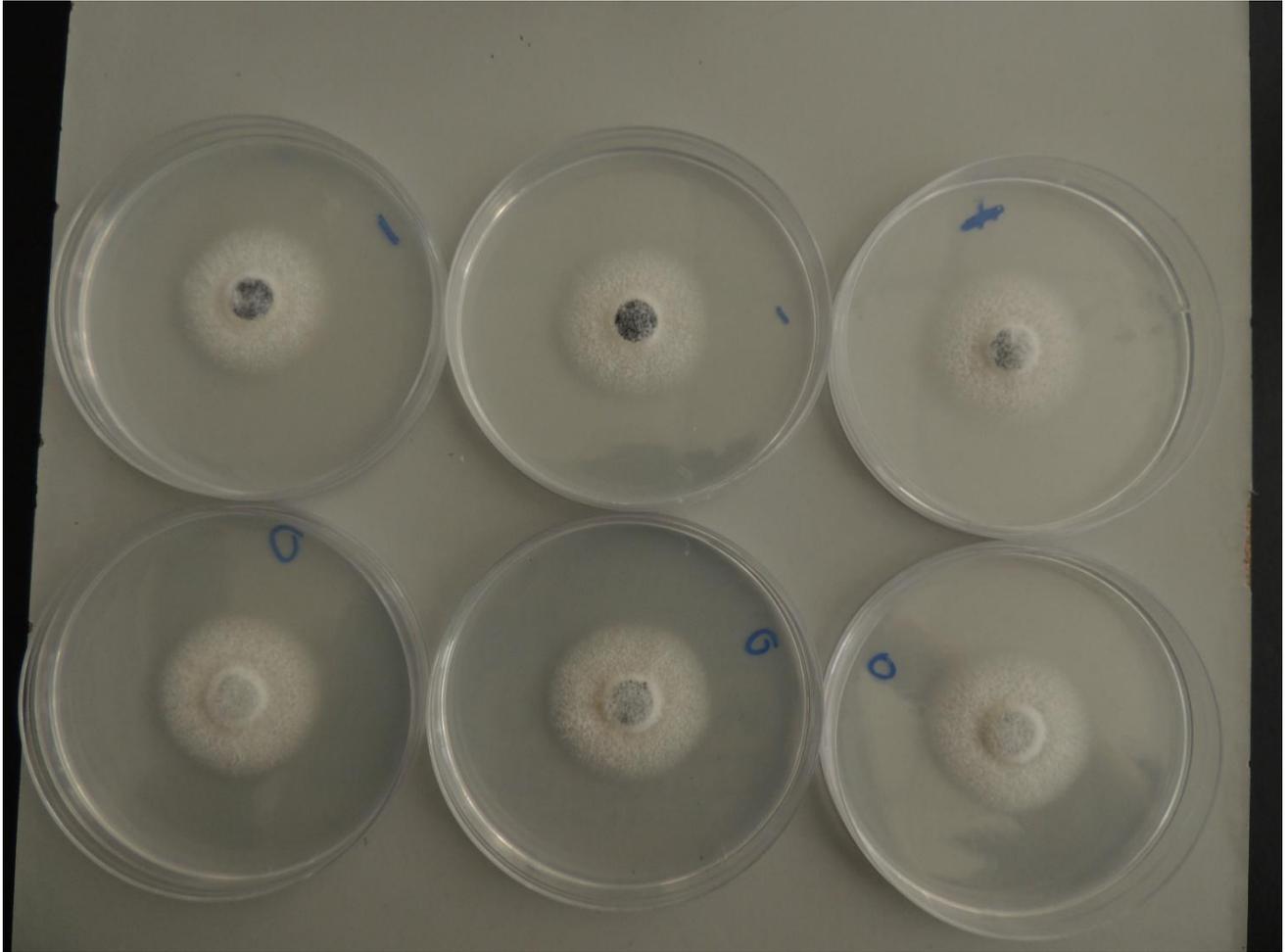
圖二十八、經 30 kV 電漿處理後培養一天的黴菌。

Fig 28. Training one day after 30kV plasma treatment mold.



圖二十九、經 30 kV 電漿處理後培養兩天的黴菌。

Fig 28. Training two days after 30kV plasma treatment mold.



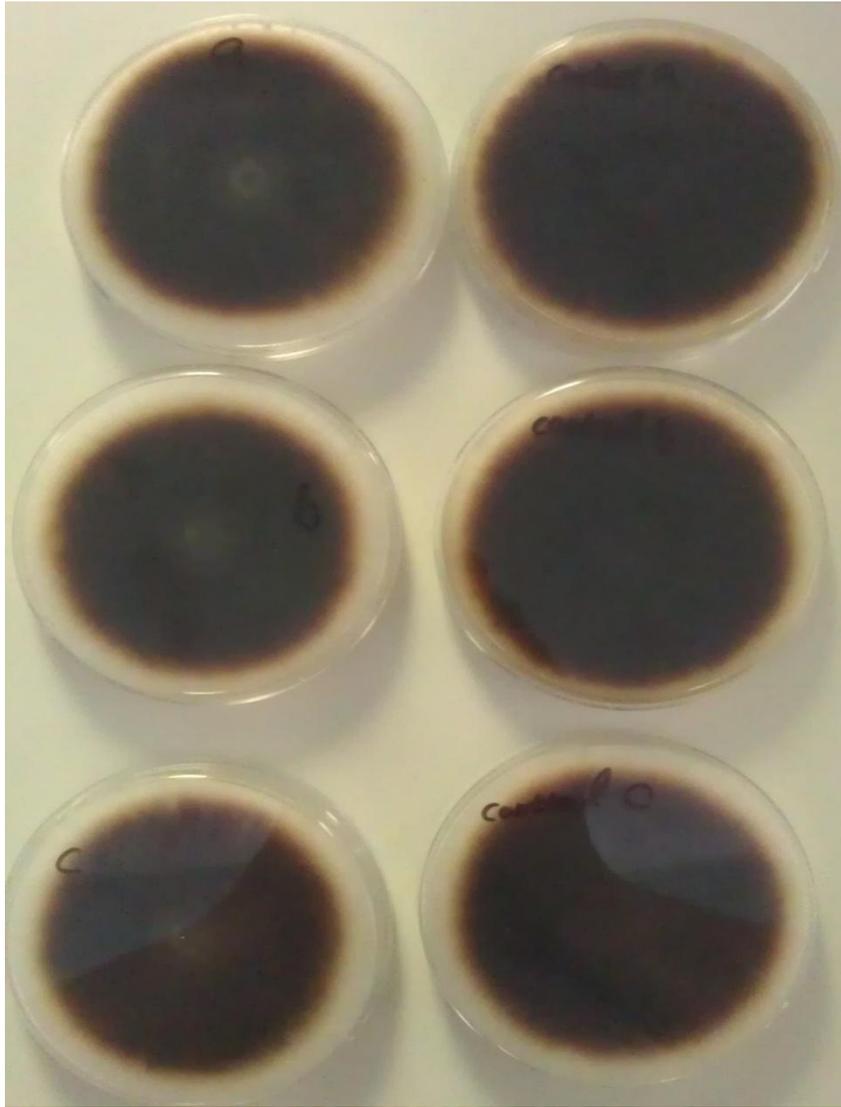
圖三十、經 30 kV 電漿處理後培養三天的黴菌。

Fig 30. Training three days after 30kV plasma treatment mold.



圖三十一、經 30 kV 電漿處理後培養十天的黴菌。

Fig 31. Training ten days after 30kV plasma treatment mold.



圖三十二、經 30 kV 電漿處理後培養十天黴菌背面。

Fig 32. The back of training one week after 30kV plasma treatment mold.

伍、結論

一、窄脈波電場的殺菌效果

能量會影響脈衝系統的殺菌效能，系統中的殺菌管數量增加、放電電容電壓越高，系統的殺菌效果會越強。而不同介質的導電度對於系統殺菌的效果，導電度越高，殺菌效果會越弱。

二、電漿的殺菌效果

電漿輸入電壓越高，處理時間越長，系統對於樣品所提供的能量也會越高，殺菌效果就越好。電漿對於不同微生物的殺菌效果，可能會因為微生物的種類不同，其殺菌有會有所影響。最後電漿對黴菌也有降低活性的效果。



陸、參考文獻

1. 李灝銘，(2001) 「以低溫電漿去除揮發性有機物之研究」，國立中央大學環境工程研究所博士論文。
2. 徐詮亮、高孟誠「電漿殺菌技術原理及其應用」，真空科技 十七卷一期。
3. 高孟誠，(2003) 「氣體電漿誘導表面改質及殺菌處理」，中原大學化學工程學系碩士學位論文。
4. 張子青，(2006) 「電漿殺菌之物理機制分析」，國立清 華大學物理學系應用物理組研究所博士論文。
5. 張展維，(2010) 「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」，東海大學食品科學研究所碩士論文。
6. 曾聖有，(2006) 「結合超音波之高窄脈波產生器應用於液態食物滅菌」，2006 第五屆台灣電力電子研討會。
7. 曾聖有，(2005) 「食物殺菌用脈衝電場產生器」國立中正大學工學院 電機工程研究所博士論文。
8. 郭雅芳，(2004) 「脈衝電場與傳統加熱處理對紅肉火龍果和仙人掌果果汁之微生物、色素及其品質之比較研究」，東海大學食品科學研究所碩士論文。
9. B. D. Ratner, A. Chilkoti, and G. P. Lopez, (1990) Plasma Deposition, Treatment, and Etching of Polymers. *Academic Press, Boston, MA.*
10. Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G. (1999). Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric

fields and nisin in skimmed milk, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 51, pp. 31-38.

11. 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.
12. Chang, D. C., D. C. Chang, B. M. Chassy, J. A. Saunders and A. E. Sowers (1992). Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego, Academic Press, Inc. **1**: 9.
13. Chang, D. C., B. M. Chassy and J. A. Saunders (1992). *Guide to electroporation and electrofusion*. San Diego, Academic Press.
14. Christian G., (2009) Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere* 75 228–233
15. Clark, P. (2006). Pulsed electric field processing, *Food Technology*, Vol. 60, pp. 66-67.
16. Cserhalmi Z., Sass-Kiss Á., Tóth-Markus M., Lechner N., (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol.7, pp. 49–54.
17. Dunn, J.E., and Pearlman, J.S., (1987) Methods and apparatus for extending the shelflife of fluid food products. *Maxwell Laboratories, Inc. U.S. Patent* 4,695,472.
18. 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.
19. Hu Miao, Guo Yun.,(2011) The sterilization of *Escherichia coli* by dielectric-barrier discharge plasma at atmospheric pressure. *Applied Surface*

Science 257 (2011) 7065–7070

20. Hüisher, 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.
21. Henry Jaeger, et al. *Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields*.
22. J.X. L (2007) : A Study on Sterilization Mechanisms and Critical Factors of High Voltage Pulsed Electric Field. *Journal of Anhui Agri . Sci.* **35**:7601 - 7603
23. Ashman L. E. and Menashi W. P., (1972) Treatment of surfaces with low pressure plasmas. *US Patent* 3701 628.
24. Martín-Belloso O., Vega-Mercado H., Qin, Chang B. L., F. J., Barbosa-Cánovas 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.
25. Martin-Belloso O., Qin B.L., Chang F.J., Barbosa-Canovas G.V. and Swanson B.G. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields, *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 20, pp. 317-336.
26. Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., and Yahia L'H., (2001) Low-temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International J. Pharmaceutics*. 226: 1-21.
27. 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.
28. Boucher R. M., (1985) State of the art in gas plasma sterilization. *Med. Device Diagnost. Indust.* 7: 51-56.

29. Pagán R., (2008) Effect of environmental factors and cell physiological state on Pulsed Electric Fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 124 260–267
30. Lerouge S., Fozza A. C., Wertheimer M. R., Marchand R., and Yahia L'H., (2000a) Sterilization by low-pressure plasma: the role of vacuumultraviolet radiation. *Plasmas and Polymers*. 5(1): 31-46.
31. Soloshenko, Khomich V. A., Tsiolko V. V., Mikhno I. L., Shchedrin A. I., and Ryabtsev A. V., (1999) Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge. In: *Proceedings of the 14th International Symposium on Plasma Chemistry*, Prague: 2551.
32. Uchida S., Houjo M., and Tochikubo F., (2008) Efficient sterilization of bacteria by pulse electric field in micro-gap. *Journal of Electrostatics* 66 427–431
33. Toepfl, S., Heinz, V., Knorr, D., (2007) High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing* 46:537–546.
34. Takhistov, P. (2006). Pulsed Electric Field in Food Processing and Preservation *Food, Science and Technology*, Vol. 149, pp. 126-131.
35. 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
36. Heniz 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 & Emerging Technologies*,Vol. 4, pp .167-175.
37. Menashi W. P., (1968) Treatment of surfaces. US Patent 3 383 163.

38. Zhang, Q.H., Barbosa-Canovas, G.V. and Swanson, B.G. (1995). Engineering aspects of pulsed electric fields pasteurisation, *Journal of Food Engineering*, Vol. 25, pp.261-281.
39. Zhang, Q. H., A. Monsalve-Gonzalez, B. Qin, G. V. Barbosa-Canovas and B. G. Swanson (1994). "Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by square-wave and exponential-decay pulsed electric fields." *Journal of food process engineering* **17**: 469.

