**微生物滅活的體外研究及機制**

**(以下文獻摘錄自成大食品研究所陳秀玲教授Hsiu-Ling Chen, 2020)**

**4.1 Pathogen decontamination 病原體淨化**

**4.1.1 *In vitro* study and mechanisms of microbial inactivation**

**The pathogen decontamination on foods was initiated by several *in vitro* studies as presented in Supplementary Information S3, which demonstrated the power of PAW against the pathogen or microbial deactivation at a certain level of reduction. The first *in vitro* study regarding the antibacterial ability of PAW was reported by Kolikov et al. (2007). This study showed that PAW activated by pulsed electrical discharge plasma inactivated *E. coli* and *Ulocladium chartarum*. Later, other studies successfully demonstrated the use of PAW for the inactivation of pathogenic microorganisms, including *S. aureus* (Kamgang-Youbi et al., 2009; Royintarat et al., 2019; Shen et al., 2016; Tian et al., 2015; Vlad et al., 2019; Xiang, Kang,et al., 2019; Q. Zhang et al., 2013), *E. coli* (Kojtari et al.,2013; Royintarat et al., 2019; Traylor et al., 2011; Xiang,Kang, et al., 2019; Xiang, Wang, et al., 2019; Zhou et al.,2018), *Pseudomonas deceptionensis* (Xiang et al., 2018), *Leuconostoc mesenteroides* (Kamgang-Youbi et al., 2009), *Hafnia alvei* (Kamgang-Youbi et al., 2009; Naitali, Kamgang-Youbi, Herry, Bellon-Fontaine, & Brisset, 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (Kamgang-Youbi et al., 2009), and the mealybug *(Planococcus citri*; ten Bosch et al.,2017). PAW efficiency in the inactivation of these microorganisms depended on the following process parameters: exposure time, reactive species composition, organic matter, microbial strain, and target surface (Attri et al.,**

**2015; Perinban et al., 2019; Vlad et al., 2019; Xiang, Kang,et al., 2019; Y. M. Zhao et al., 2020).**

**食品的病原體去污是由幾項體外研究開始的，這些研究展示了PAW在一定減少水平下對病原體或微生物去活化的效果。關於PAW抗菌能力的首個體外研究是由Kolikov等人於2007年報告的。這項研究顯示，通過脈衝電漿激活的PAW能夠使大腸桿菌和炭疽菌失活。隨後，其他研究成功證明了PAW在失活病原微生物方面的應用，包括金黃色葡萄球菌*S. aureus*（Kamgang-Youbi 等人，2009 年；Royintarat 等人，2019 年；Shen 等人，2016 年；Tian 等人., 2015；Vlad 等人，2019 年；Xiang,Kang 等人，2019 年；Q. Zhang 等人，2013 年），大腸桿菌*E. coli*（Kojtari 等人，2013 年；Royintarat 等人，2019 年；Traylor et al., 2011;Xiang, Kang, et al., 2019;Xiang, Wang, et al., 2019;Zhouetal., 2018), 假單胞菌 *Pseudomonas deceptionensis* (Xiang et al., 2018), 腸膜明串珠菌Leuconostoc mesenteroides (Kamgang-Youbi et al., 2018) al., 2009), 哈夫尼亞腸桿菌 Hafnia alvei (Kamgang-Youbi et al., 2009; Naïtali, Kamgang-Youbi, Herry, Bellon-Fontaine, & Brisset, 2010)；釀酒酵母Saccharomyces cerevisiae (Kamgang-Youbi et al., 2009)；粉蚧mealybug（Planococcus citri；10 Bosch 等，2017）。 PAW 滅活這些微生物的效率取決於以下過程參數：暴露時間、活性物種組成、有機物、微生物菌株和目標表面（Attri 等人，2015 年；Perinban 等人，2019 年；Vladetal。 , 2019;Xiang,Kang, et al., 2019;YMZhaoetal., 2020)。**

**關於PAW 的哪些反應性物種對微生物失活最負有責任，存在相當大的爭議。例如，Q. Zhang 等人。 (2013) 報導，就 H2O2、羥基自由基 (•OH) 和臭氧 (O3) 而言，ROS 在金黃色葡萄球菌的滅活中起重要作用。與此同時，Thirumdas 等人。 (2018) 建議 PAW 中產生的 O3 和 H2O2 是這種抗菌活性的主要原因。含有 NO2−、NO3− 和 H2O2 的溶液顯示出與 PAW 相同的抗菌活性，並且優於僅含有一種物質的溶液（Naï-tali 等，2010）。這表明這些物質可能協同作用於 PAW 的抗菌活性（Naïtali 等，2010）。同樣，Xiang et al. (2018) 還證實了這三種反應物種在假单胞菌CM2 (P. deceptionensis CM2 )滅活中的協同作用。此外， NO3− 和 H2O2 以及O3 對蝦體內微生物生長的抑製作用顯著（Liao, Su, et al., 2018）。Traylor et al. (2011) 提出 H2O2 在 PAW 中具有顯著的抗菌活性。一些報告強調了過氧亞硝酸鹽 (OONO−) 的作用，它是由 H2O2 和 NO2− 持續產生的（Lukes 等人，2014 年；Zhouetal.，2018 年）。**

**盡管用於微生物滅活的最有效的物質，以及其確切機制仍然存在爭議，但許多作者認為 PAW 的抗菌活性通過物理化學特性（包括 ROS、RNS、pH、UV輻射和 ORP）促進了協同作用（Kamgang-Youbi 等人，2009 年；Thirumdas 等人，2018 年）。依據文獻，電漿水的低pH 值在治療中起著關鍵作用（Naïtali 等人，2010 年；Y.M.Zhaoetal.，2020 年）。 Los、Ziuzina、Boehm、Cullen 和 Bourke（2020 年）也在相同的 pH 值（~2.4）下對 PAW 和酸化水 (AW) 進行了比較，發現用 PAW 和 AW 處理可以將細胞活力降低 40.0 和在 2 小時的接觸時間分別為 21.4%。雖然 PAW 比 AW 更有效地對抗黃曲霉孢子，但它不被認為是這些抗菌特性的唯一原因（Korachi & Aslan，2011；Traylor 等，2011）。 I.Joshi et al. (2018) 揭示了 pH 在產氣腸桿菌滅活中的作用微不足道，並表明在微生物滅活過程中，較高的 ORP 和活性物種濃度表現得更好。此外，Naïtali et al. (2010) 證明 NO2−、NO3− 和 H2O2 使微生物種群減少了 50%（Naïtali et al.，2010）。據報導，由水下直接等離子體形成的紫外線輻射可減少 40% 至 50% 的細菌總數（Spetlikova、Janda、Lukes 和 Clu-pek，2010）和 30% 的大腸桿菌*E. coli* （Lukes、Clupek、Babicky 和 ​​Sunka，2008 年）。總的來說，因此可以得出結論，PAW 特性包括 ROS、RNS、pH、ORP 和紫外線輻射，都有助於細菌滅活。**

**基於 PAW 的微生物滅活機制仍在研究中，許多項相關研究表明，PAW 物種的微生物滅活是由於它們與微生物的生物成分相互作用，進一步導致細胞膜破裂、脂質過氧化、膜滲漏、形態變化、DNA 損傷和蛋白質修飾。 （L. Guo et al., 2018 ；Lukes et al.,2014 ；Mai-Prochnow、Clauson、Hong 和 Murphy，2016）。**

**膜破裂和滲漏**

**膜破裂和滲漏可使 PAW 反應性物質進入並破壞細胞。它們與電穿孔和脂質過氧化有關（Perinban 等，2019）。電穿孔誘導細胞膜通透性並形成脂質過氧化（Thirumdas 等，2018）。此外， PAW 具有高度歸因於微生物滅活的高強度電場（Lukes、Locke 和 Brisset，2012）。這種電荷穿過細胞膜的發展還可以提高膜的通透性並產生允許活性物質（ROS 和 RNS）進入細胞的脂質過氧化（Thirumdas 等，2018）。**

**此外，涉及 PAW 中存在的幾種反應性自由基（ROS 和 RNS）的脂質過氧化也可以誘導細胞膜破裂（Dolezalova & Lukes，2015；Q. Zhang et al., 2013）。 •OH 自由基具有高度反應性並產生顯著的氧化應激從而氧化細胞膜的脂質雙層（尤其是含有多不飽和脂肪酸 [PUFA] 的那些）並引發脂質過氧化（Q. Zhang 等，2013）。 OONO− 也被認為是脂質過氧化的另一種引發劑。 Rubbo、Trostchan-sky 和 ​​O’Donnell (2009) 報導了含脂質的不飽和脂肪酸的過氧化反應，OONO− 產生的 CO3• 自由基是一種重要的氧化劑 (Lymar & Hurst, 1998)。Zhou et al.,(2018) 證明了 OONO− 在大腸桿菌滅活中的關鍵作用，與 PAW 中存在的其他反應性物種相比，這種作用更有效，其中酸性環境（較低的 pH 值）共同促進和啟動脂質過氧化（Perinban 等，2019）。根據 S. G. Joshi 等人的說法（2011），單線態氧（1O2）和H2O2負責膜脂過氧化，導致細胞膜損傷並引發細胞內成分洩漏。這種洩漏同時允許其他反應性物質穿透細胞。例如，由 PAW 氮物種產生的不帶電荷的過氧亞硝酸 (ONOOH) 滲透到細菌細胞內部，可能會分解成高氧化性的 NO2• 和其他•OH 自由基進一步破壞微生物來自細胞內區域內的細胞（Perinban 等，2019）。也有人提出水分子在膜滲漏後進入細胞並引起細胞腫脹（水腫變性），從而導致細胞死亡（Zhou et al., 2020）。**

**此外，丙二醛 (MDA) 可用作脂質過氧化的生物標誌物，因為它是脂質過氧化最常見的副產物之一。 Alkawa-reek、Gorman、Graham 和 Gilmore（2014 年）證明，暴露於電漿水的大腸桿菌細胞的 MDA 水平呈線性增加，表明脂質雙層被氧化，隨後導致細胞內壁的滲漏。暴露在電漿水的微生物細胞、大腸桿菌細胞中三磷酸腺苷 (ATP) 的濃度顯著增加，證明細胞內滲漏成功（Alkawareek 等，2014）。除了 MDA 外，還可以通過測量微生物靶標的膜電位 (MP) 來評估微生物膜的洩漏。 MP 是生物細胞的細胞內和細胞外區域之間的電勢差。Liao, Li et al., 2018通過電位敏感探針 DiOC2(3) 觀察了大腸桿菌細胞的 MP，並報告在蘋果汁中進行冷電漿處理後 MP 顯著降低。較低的 MP 顯然是指細胞膜的破壞。 Tian et al., 2015對細胞 MP 的去極化進行了另一項研究。PAW-A（具有較低的 ORP 和 EC）和 PAW-B（具有較高的 ORP 和 EC）用於滅活金黃色葡萄球菌。與 PAW-A 相比，PAW-B 具有較低的 MP；因此，具有較高 ORP 和 EC 的 PAW 可以去極化並損壞細胞膜（Tianetal., 2015）。此外，1-N-苯基萘胺 (NPN) 和碘化丙啶 (PI) 攝取測定，Xiang et al. (2018) 揭示了 PAW 處理後假單胞菌(Pseudomonas peceptionensis) 的細胞和細胞質膜完整性喪失。**

**此外，Q. Zhang 等人。 (2013) 報導氧化應激或脂質過氧化引起的膜損傷也會影響微生物表面結構、化學狀態和細胞膜完整性。 X射線光電子能譜、原子吸收光譜和透射電子顯微鏡的結果證明了細胞表面的化學狀態、細胞膜的完整性以及細胞內部成分（Q. Zhang et al., 2013）。同時，掃描電子顯微鏡的結果也表明，由於細菌細胞損傷，經處理的食物表面的改變使 PAW 處理後表面破裂（Ma et al., 2016；Royintarat et al., 2020）。從這些可用的研究中，重要的是要強調 PAW 可能引發膜損傷，導致細胞死亡。**

**此外，由於細菌細胞壁的剛性和韌性，存在一個問題，即 PAW 或等離子體中的活性物質如何穿透它。 Yusupov et al., 2013使用反應性分子動力學模擬，研究了多種等離子體反應性物質（包括 OH、H2O2、O、O3、以及 O2 和 H2O）與細菌肽聚醣之間的相互作用。有趣的是，結果顯示 OH、O、O3 和 H2O2 會破壞肽聚醣的結構上重要的鍵（C-O、C-N 或 C-C 鍵），預計這些鍵會導致細菌細胞壁受損。（Yusupov 等，2013）。然而，這個主題需要通過未來的體外研究進行更多的研究。**

**DNA、蛋白質和細胞內破壞**

**當活性物質進入細胞內時，它們會相互作用並破壞細胞內部的細胞，例如 DNA/RNA、蛋白質、線粒體和核醣體（Perinban et al., 2019）。 H. Chen、Bai 和 Xiu (2010) 報導了電漿處後 DNA 和蛋白質降解。值得注意的是，這些研究人員觀察了電漿對釀酒酵母細胞週期的影響。結果顯示，處理後的細胞顯示出 G1 細胞數量顯著增加，這表明細胞週期在 G1 期停滯，可能與 DNA 和蛋白質損傷有關。這也是第一項證明電漿誘導的 DNA 破壞與細胞週期、突變和細胞凋亡之間可能存在關聯的研究（H. Chen et al., 2010）。**

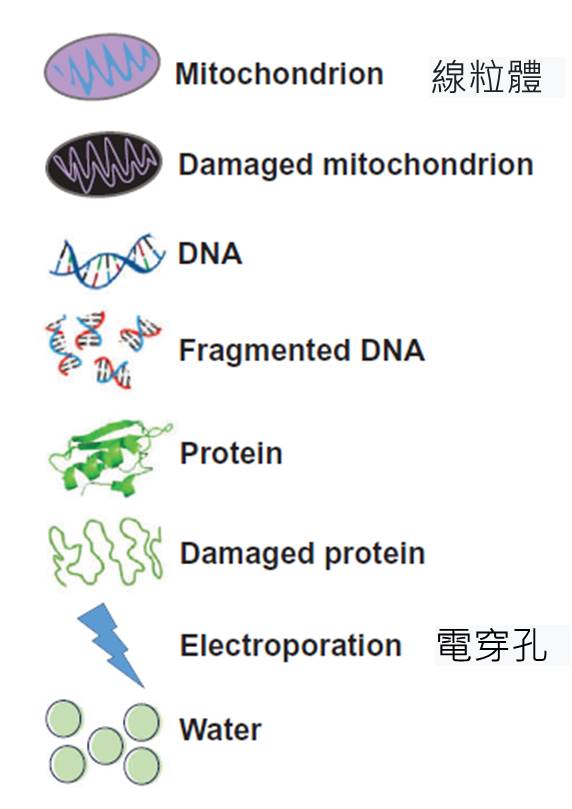
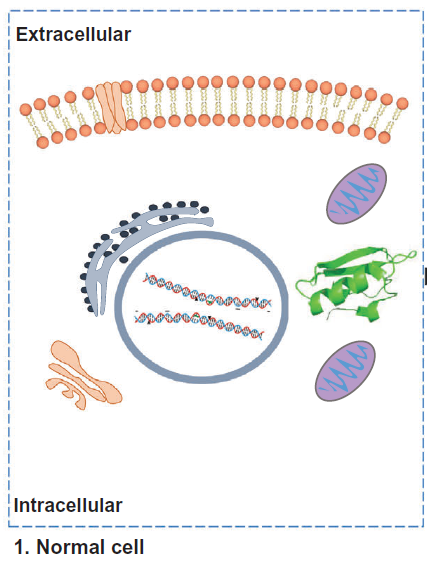
**後來，Korachi 和 Aslan (2011) 還報告了在使用大氣電漿滅活大腸桿菌和金黃色葡萄球菌期間發生的 DNA 損傷。這些研究人員還提出，電漿水中反應性物質可能會直接或間接靶向並導致細菌細胞的 DNA 降解，而不會破壞細胞膜（Korachi & Aslan，2011）。此外，據報導，脂質過氧化的最終產物 MDA 能夠通過形成脫氧鳥苷和脫氧腺苷的加合物來破壞 DNA，隨後導致細胞死亡（Marnett，1999）。同時，蛋白質的破壞可能是由於 PAW 中存在的 ROS 破壞了氫鍵、硫鍵和肽鍵，從而改變了蛋白質的一級、二級和三級結構，進一步導致酶活性細胞下降。（Mai-Prochnow et al., 2016）。**

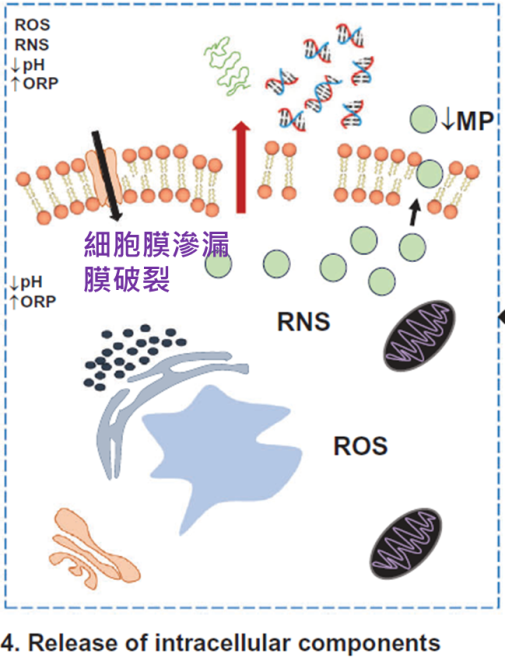
**由於機制和 PAW 物種的複雜性，Perinban et al., (2019) 還認為 PAW 可能在細胞內引起其他幾種生物學現象，包括抑制線粒體呼吸、基因突變核醣體損傷、壞死和細胞凋亡。**

**細胞內成分的釋放**

**細菌細胞的細胞內破壞之後是細胞內或細胞質內容物的排出。細胞內蛋白質和核酸在等離子處理後釋放（H. Chen 等，2010）。酵母 S. cerevisiae ATCC 4126 在大氣壓下用 DBD 空氣等離子體處理。在等離子處理後酵母細胞大量死亡後，這些作者還發現細胞外核酸水平顯著增加以及細胞內蛋白質水平降低（H. Chen 等，2010），這表明被破壞的核酸和蛋白質被釋放到細胞膜外。與此同時，翔等人。 (2018) 發現用 PAW 處理 10 分鐘後，P. deceptionensis 的細胞外核酸和蛋白質水平分別急劇增加 155.4% 和 161.4%。同樣，Q. Zhang 等人。 (2013) 報導了在金黃色葡萄球菌失活的 PAW 處理後，從細胞質中釋放的 K+、DNA/RNA 和蛋白質的水平增加。這些作者還建議更小的離子，例如鉀和磷酸鹽，首先被釋放，然後是 DNA/RNA，然後是蛋白質（Q. Zhang et al., 2013）。後來，Tian et al. (2015)證實了 PAW 後細胞內蛋白質和核酸的釋放，積極揭示 DNA/RNA 和蛋白質的放電。最近，Los 等人（2020）還揭示了在黃曲霉滅活過程中，PAW 處理後細胞外 MDA、DNA/RNA 和蛋白質的增加，表明細胞膜破裂後細胞內物質的釋放。細胞外核酸和蛋白質的增加也可歸因於細胞壁和膜破壞（Los 等，2020；Xiang 等，2018）。下圖顯示了 PAW 如何滅活病原微生物的可能機制。**

****



****

