

採收時間及遮陰對芥藍菜(*Brassica oleracea* L.)

氮組成及硝酸還原酵素活性的影響¹

倪禮豐² 鍾仁賜³

摘要

硝酸態氮是植物從土壤中吸收主要的氮形態之一，但若食用硝酸態氮累積過多之蔬菜則對人體有害，臺灣地區芥藍菜消費量甚大，故其可食部位硝酸態氮濃度值得吾人重視。本試驗以水耕栽培芥藍菜，探討氮形態之日週期變化及各部位之硝酸還原酵素活性與硝酸態氮之關係。以含有 7mMNO₃-與 1mMNH₄⁺之水耕液栽培芥藍菜之結果顯示，全株葉片、葉柄，莖與根部之還原態氮濃度隨採收時間及遮陰處理均無顯著之變化，停用硝酸態氮處理可降低芥藍菜各部位之硝酸態氮濃度，葉片中硝酸還原酵素活性約為葉柄及莖中之十倍，硝酸態氮濃度約為葉柄及莖之二分之一。

(關鍵詞：芥藍菜，採收時間，遮陰，硝酸態氮，硝酸還原酵素)

¹花蓮區農業改良場研究報告第 128 號，本文為第一作者碩士論文之一部分。

²花蓮區農業改良場作物環境課助理。

³國立台灣大學農業化學研究所教授，本論文指導教授。

前言

在一百年前美國堪薩斯州(1895)，Mayo 氏發現玉米稈中硝酸根離子對家畜的毒性，此報告是最早被引用與硝酸根離子相關的文獻。其後數十年不斷有報告指出，攝取過量的硝酸根離子會對人畜產生毒害(Wright and Davison, 1964)。其實硝酸根離子本身對人畜的毒性不大，但是在貯藏的過程和消化道中可能會被微生物還原為亞硝酸根離子，卻會引起血紅素中的鐵氧化變性(hemoglobin→methemoglobin)，喪失攜氧能力而造成缺氧的各種症狀，諸如：一些初生幼兒被餵以硝酸根離子含量過高的蔬菜泥後所發生的蒼藍症(cyanosis)；對家畜則常引起貧血症狀甚至流產；另外亞硝酸根離子與二級胺形(secondary amines)成亞硝酸胺(nitrosamines)而成為眾所皆知的誘變劑和致癌劑(Maynark et al., 1970；蔡等 1989)。因此在有關食品安全的規定中，有限制食品添加物及藥劑中亚硝酸根離子和硝酸根離子的含量，但是一般大眾日常食用的蔬菜卻無規定。

對植物而言，氮素是碳、氫及氧之外最重要的元素，為構成生命物質（核酸和蛋白質）的主成分。可被植物吸收的無機態氮形態一般分成銨態氮和硝酸態氮；銨態氮可直接進入谷胺酸循環而同化；硝酸態氮則必須先還原成銨態氮才可被利用，此一過程需消耗許多能量(Shaner and Boyer, 1976；Nicholas et al., 1976；Campbell and Smarrelli, 1978)。除非在酸性和還原狀態（如浸水）下銨態氮才能穩定存在，否則在鹼性和好氣條件下銨態氮會以氨氣揮發和

被微生物作用氧化為硝酸態氮（硝化作用 Nitrification）；因此對一般植物而言，硝酸根離子是大部分土壤中主要的有效氮形態。植物吸收銨態氮後會造成介質（常是土壤）的酸化（王與吳 1992；池田 1986），過多累積在體內會氮中毒；相對於銨態氮，植物吸收硝酸態氮則造成介質的鹼化，但在植物體內累積毒性卻遠較銨態氮為低，因此植物在體內累積硝酸根離子是一種自然的現象。提高供肥強度後，植物更容易累積高量的硝酸根離子在體內（篠原 1986；Vogtmann et al., 1984）。

隨著經濟的發展和肥料工業的發達，使農作物中硝酸根離子濃度有增高的趨勢，其中以供人食用的葉菜類尤其值得關心。本省葉菜類的消費量甚大，依台灣農業年報(1993)，栽培面積和產量分別約為 120,000 公頃及每年 1,900,000 公噸，其中芥藍菜之消費量在台北市單月即有 367,135 公斤，其硝酸根離子的濃度吾人應予以重視。

既然吸收過多的硝酸根離子可能對人體有傷害，吾人應在不影響葉菜類產量的前提下盡可能的降低葉菜類中硝酸根離子的濃度。有許多因子影響植物累積硝酸根離子，如植物本身對硝酸根離子吸收、轉運和同化的內在特性(Rufty et al. 1982)，以及硝酸根離子的供給強度和其它如日照和溫度等外在環境因素。如大豆吸收硝酸根離子的速率日夜相差不大，但還原速率夜間不及日間之一半(Rufty et al. 1984)；甜菜葉部硝酸根離子之濃度在日出後下降，日落後上升(Maynark et al.,1970)；遮陰提高小白菜硝酸態氮之濃度（王與吳 1992；蔡等 1989；吳與王 1995）；晴天下午採收較早晨採收之硝酸根離子濃度為低（吳與王 1995）。故吾人可推測植物體內的硝酸根離子濃度也應有日的週期變化。若如預期每日有明顯之硝酸根離子濃度高低峰，則在低峰時期採收可利用植物本身之還原能力降低葉菜類中之硝酸根離子濃度。另外葉菜類的可食部位可分為葉片、葉柄和莖等，各部位的硝酸根離子濃度可能有不同，吾人如能對此一訊息有所了解，對食用部位的選擇應有幫助，使吾人吃得更健康。

材料與方法

一、材料：

（一）供試品種：

芥藍菜[Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)]，購自農友種苗公司。

（二）養液製備：

採用 Johnson 的修正培養基(Johnson et al., 1957)，其配方如表一所示。

表一、水耕養液配方

Table 1. The composition of nutrient solution for vegetable growing in the experiment

Compound	concentration
KNO ₃	6mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	2mM

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1mM
KCl	50μM
H ₃ BO ₃	25μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	2μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5μM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O(81% MoO ₃)	0.5/7μM
Fe-EDTA	20μM

二、方法：

(一) 水耕栽培與處理：

以 20 公升之塑膠桶，保麗龍板 (60×45×3cm³) 浮根式栽培 (高, 1991)，每桶六株，每 10 日換一次水耕液，充分通氣，培養至約十葉齡，分控制組、停用硝酸態氮組和遮陰組三種處理。首日 21:00 收後開始處理，之後每六小時 (3:00,9:00,15:00,21:00) 採樣一次，每處理三重複，連續採三日。控制組以相同之水耕液繼續培養；停用硝酸態氮組以 KCl 和 CaCl₂ 補足 K⁺ 和 Ca²⁺，其餘配方同控制組；遮陰組在翌日早上 9:00 以遮光 55% 的黑網遮陰，其餘同控制組。採收植體全株分葉片、葉柄、莖與根，稱鮮重，以液態氮急速冷凍，置於 -70 冰箱中保存；將樣品冷凍乾燥，稱乾重。

(二) 植體分析

1. 硝酸態氮之測定：

取 0.2g 乾燥植體，以 50mL 1N HCl 振盪抽取二小時，取 5mL 抽出液於三角瓶，加入 40mL 0.7M 氨水、蒸餾水和 1mL MnSO₄ 使其總體積為 50mL，加入 100mg 鋅粉，振盪 30 分鐘過濾；取 2mL 濾液，加入 46mL 蒸餾水、1mL 重氮試劑(diazotizing reagent)和 1mL 偶合試劑(coupling reagent)，呈色 30 分鐘，標準溶液以 50ppm KNO₃ 配製，使終濃度為 0.04-0.16ppm 作標準曲線測，540nm 吸光值(林與陳, 1986)。

重氮試劑--以 100mL 2.4N HCl 溶解 0.5g sulfanilamide

偶合試劑--以 100mL 0.12N HCl 溶解 0.3g N-(1-naphthyl-ethylene)diamine

MnSO₄--10g MnSO₄ 加 51mL 冰醋酸，定量至 1,000mL

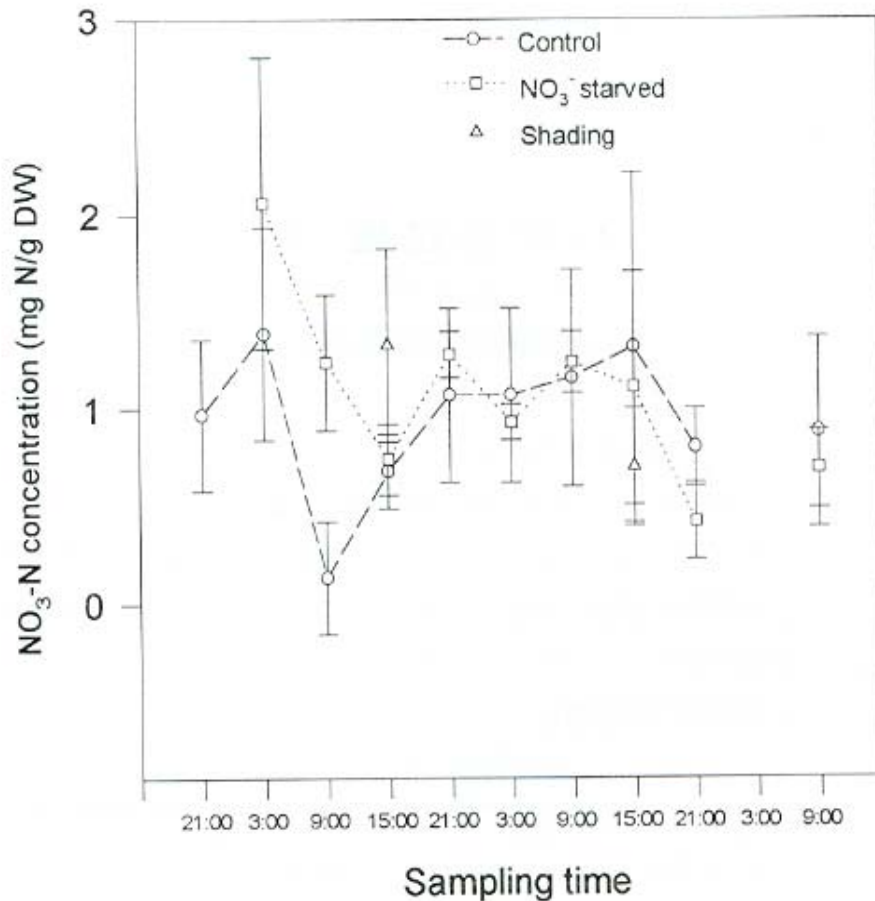
2. 還原態氮之測定：

取上述硝酸態氮測定法中之 1NHCl 抽出液以凱氏法測定可溶性還原態氮；取抽出後之殘餘物連同濾紙以濃硫酸消化後以凱氏法測定不溶性還原態氮。

(三) 芥藍菜硝酸還原酵素活性測定

1. 栽培方法

民國八十三年八月二十三日播種，九月一日移入人工氣候室，一組於 20 / 15 (日 / 夜) 自然光室，另一組於 30 / 25 (日 / 夜) 自然光室，水耕栽培至十月十二日。上午九時採收對照組，並對遮陰組處理，下午三時採收對照組及遮陰組，稱取 1.0g 及 2.0g 第一展開葉片和葉柄、莖與根於液態氮中急速冷凍保存。1.0g 樣品供硝酸還原酵素活性測定，2.0g 樣品經冷凍乾燥後，稱乾重，測植體中硝酸態氮濃度。



圖一、各處理對芥藍菜葉片中硝酸態氮濃度日變化之影響

Fig.1. Effect of different treatments on diurnal changes of NO₃-N concentration in blades of kale.

2. 硝酸還原酵素活性測定

取 1.0g 冷凍之新鮮植體於研鉢中，加入 0.6g PVPP(poly vinyl poly pyrrolidone)及少許液態氮充分研磨，加入 6mL 萃取液，混合均勻後以 30,000g，4℃ 下離心 15 分鐘，取 0.5mL 上澄液於試管中，加入 0.5mL 反應液，30℃ 水浴下反應 30 分鐘，再加入 1mL 1% Sulfanilamide 以及 1mL 0.2% N-(1-naphthylethyl)enediamine 呈色 30 分鐘後測 540nm 吸光

萃取液包括 50mM tris-HCl pH 7.8

15% Glycerol

14mM B-mercaptoethanol

1mM EDTA

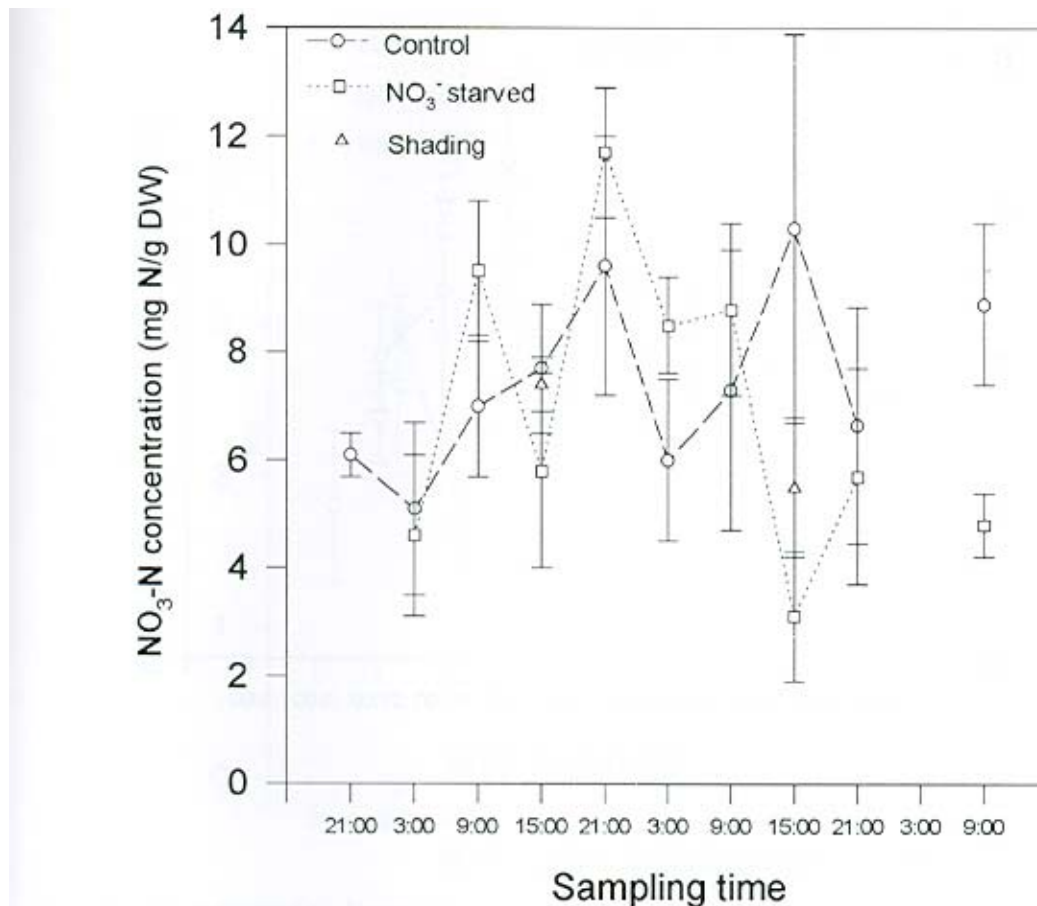
0.1% Triton X-100

反應液包括 25mM phosphate buffer pH 7.5

5mM L-cysteine

10mM KNO₃

0.2mM NADH



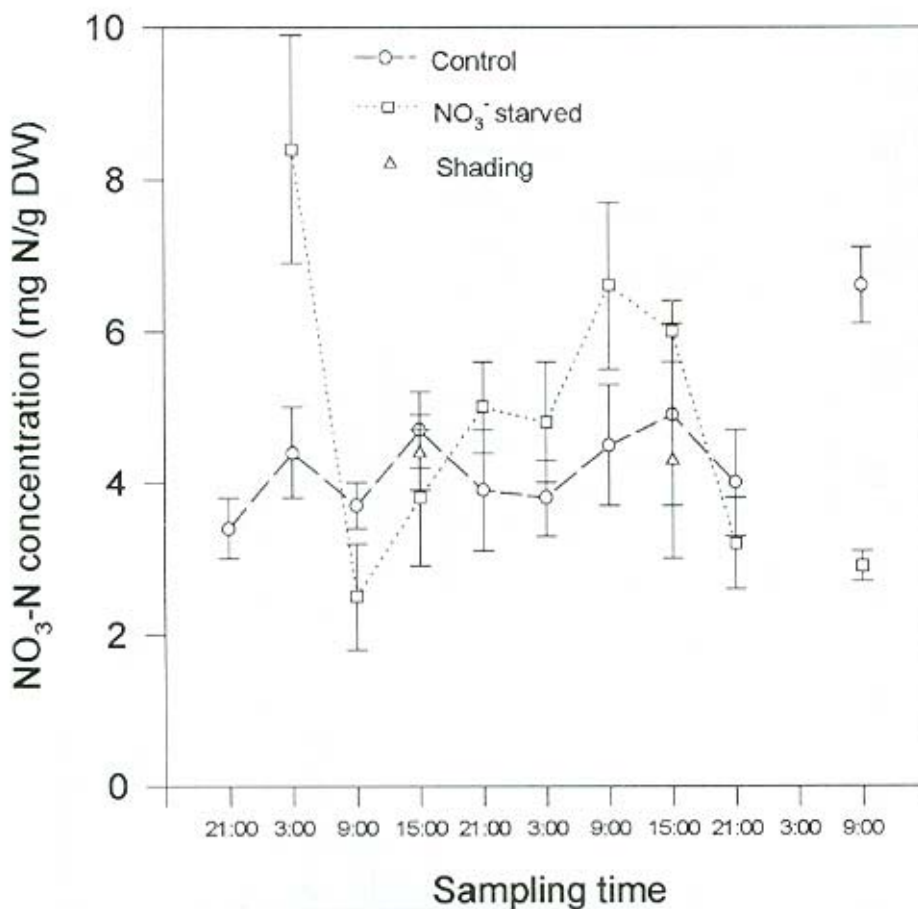
圖二、各處理對芥藍菜葉柄中硝酸態氮濃度日變化之影響

Fig.2. Effect of different treatments on diurnal changes of NO₃-N concentration in petioles of kale.

結果與討論

一、採樣時間、遮陰處理與停用硝酸根離子處理對芥藍菜葉片、葉柄、莖與根中氮組成之影響

各處理對芥藍菜葉片之硝酸態氮濃度在六十小時內影響不顯著（圖一）。停用硝酸根離子處理在前二日對葉柄與莖中硝酸態氮濃度無顯著影響，在第六十小時後顯著降低約一半（圖二、圖三），在根中處理六小時後即顯著下降（圖四）。遮陰處理對各部位硝酸態氮濃度皆無顯著影響。各處理對葉片、葉柄、莖與根中還原態氮影響不顯著，其平均濃度如表二。



圖三、各處理對芥藍菜莖中硝酸態氮濃度日變化之影響

Fig.3. Effect of different treatments on diurnal changes of NO₃-N concentration in stems of kale.

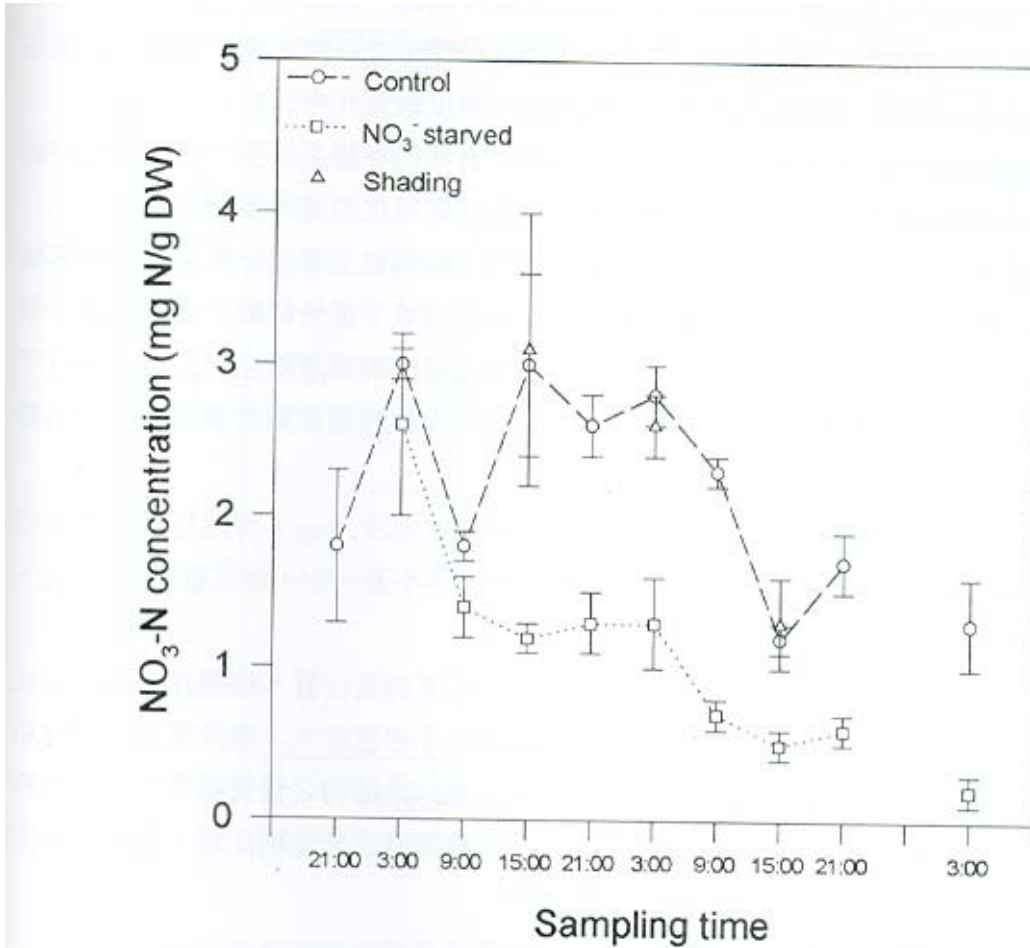
表二、水耕芥藍菜植體中還原態氮濃度

Table 2. Reduced nitrogen concentration in kale

Plant part	Insoluble nitrogen (mg/g DW)	Soluble nitrogen (mg/g DW)
Blade	21.1±8.2	1.7±0.7
Petiole	7.5±3.0	1.9±0.6
Stem	8.6±2.2	2.1±0.6
Root	34.2±2.4	1.6±0.5

本試驗芥藍菜葉片中硝酸態氮濃度無顯著之日變化，約在每克乾重 0.5 ~ 1.5mg 之間，且遮陰處理亦無顯著差異（圖一），推測其原因乃是本實驗採全株樣品混合分析，而各部位之生理年齡差異很大而造成，如將老葉和新葉合併分析，因此造成重複間變異大。葉柄、莖與根中硝酸態氮濃度亦無顯著之日變化，對照組葉柄中濃度約每克乾重 5 ~ 10mg（圖二），莖

中約為 3-5mg (圖三)，根中約為 1-3mg (圖四)。在停用硝酸根離子處理後，葉片中硝酸態氮濃度並沒有因此而顯著下降，反而在葉柄、莖與根中的濃度有緩慢下降的趨勢，原因可能有二；一是在葉柄、莖與根中硝酸還原酵素活性大於葉片，二是硝酸根離子由葉柄、莖與根轉運至葉片之速率不小於葉片中硝酸態氮同化之速率。由下項硝酸還原酵素活性測定結果中，葉片硝酸還原酵素活性大於在葉柄、莖與根中之活性，可知第一項是不正確的，因而硝酸態氮是由下向上運輸。



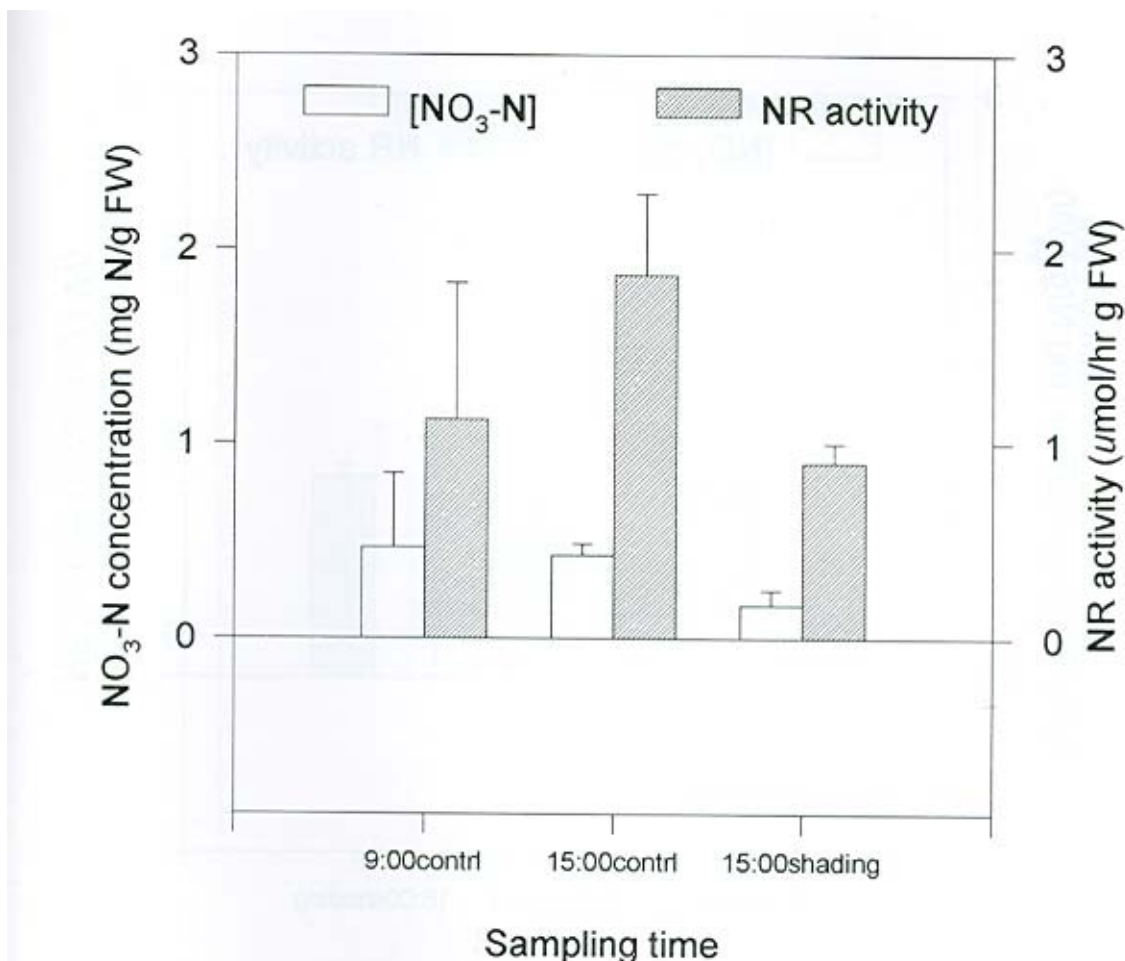
圖四、各處理對芥藍菜根中硝酸態氮濃度日變化之影響

Fig.4. Effect of different treatments on diurnal changes of NO₃-N concentration in roots of kale.

依植物生理功能劃分，葉片為營養器官，有大量之葉綠體與各種蛋白質；葉柄為輸導器官，細胞中液泡佔極大比例，水分濃度較葉片為高。硝酸根離子在植體中可能先貯存在液泡中，而後在細胞質中被還原，因此在植體中之硝酸根離子濃度主要決定於液泡之大小。如此可解釋為何葉柄中硝酸根離子濃度較葉片中為高。

有些植物是在葉片中硝酸還原酵素活性最強，有些則在根系最強，葉柄和莖的硝酸還原能力大部分植物都很弱，因此將液泡中硝酸態氮同化的速率很慢。

植物體中可溶性的還原態氮濃度很低，可溶性還原態氮主要成分應是游離胺基酸及小分子胍類，因為植體內游離銨離子過多時，中性環境下部分銨離子會放出質子形成的氨分子而抑制呼吸作用，造成氨中毒。故游離胺基酸的濃度隨生理的情況而有不同，氮代謝旺盛時則濃度高，反之則低，在本實驗中可溶性還原態氮濃度隨樣品個體變異很大。

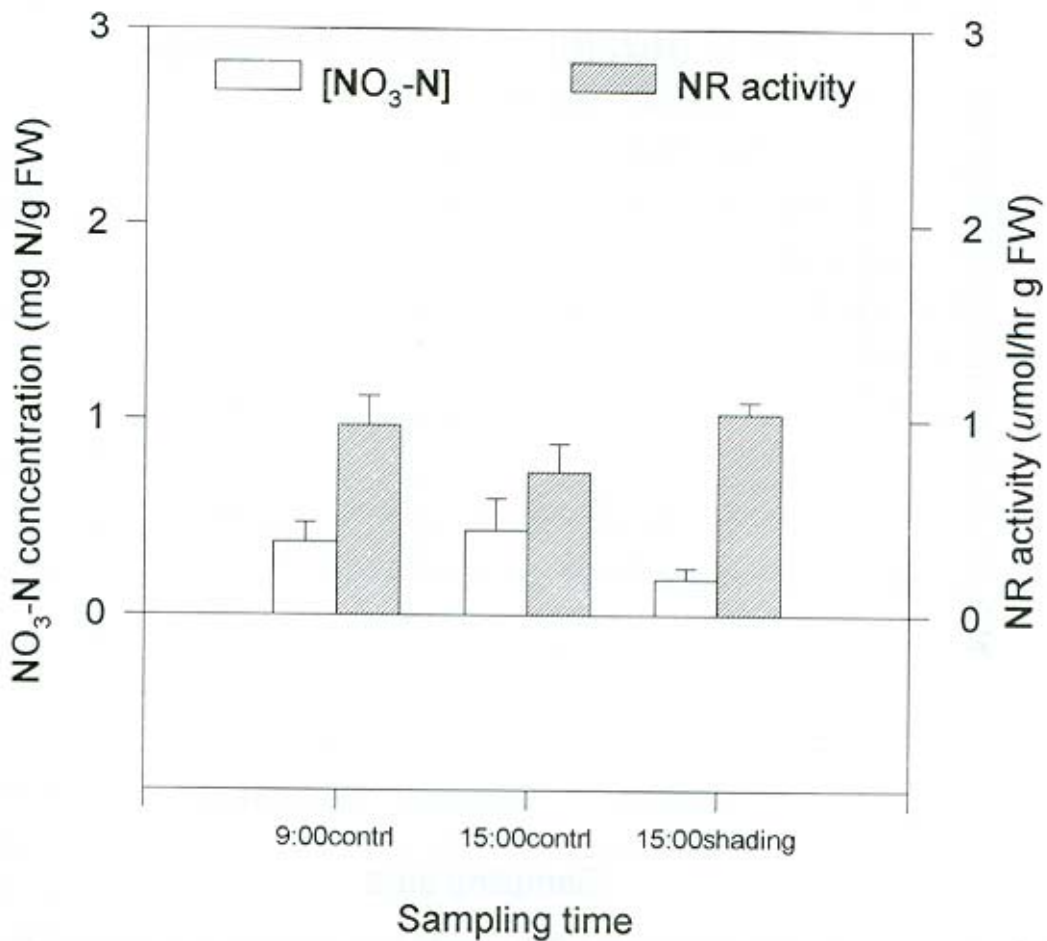


圖五、不同時間和遮陰處理對芥藍菜葉片中硝酸態氮濃度及硝酸還原酵素活性之影響
20/15°C (日/夜)

Fig.5. Effect of time and shading on NO₃-N concentration and nitrate reductase activity in blades of kale at 20/15°C (day/night)

不可溶性氮在植體葉片中佔總氮之大部分，每克乾重 21.1mg，可溶性還原態氮和硝酸態氮各佔餘下之一半；葉柄中不可溶性氮亦佔總氮不及一半，每克乾重 7.5mg，硝酸態氮佔約二分之一，可溶性還原態氮佔約一成。

不可溶性氮在植體內的角色為構成生命物質 - 核酸與蛋白質。核酸在細胞中組成幾乎不變，則其濃度主要決定於細胞的密度，細胞愈小密度愈大，濃度愈高。葉片中細胞密度較葉柄為大，因此核酸形式氮濃度較高。葉片為植物之營養器官，內含有許多酵素，以及如葉綠素等非蛋白質含氮物質。與為輸導器官之葉柄比較，總氮濃度則高出一倍以上。



圖六、不同時間和遮陰處理對芥藍菜葉片中硝酸態氮濃度及硝酸還原酵素活性之影響
30/25°C (日/夜)

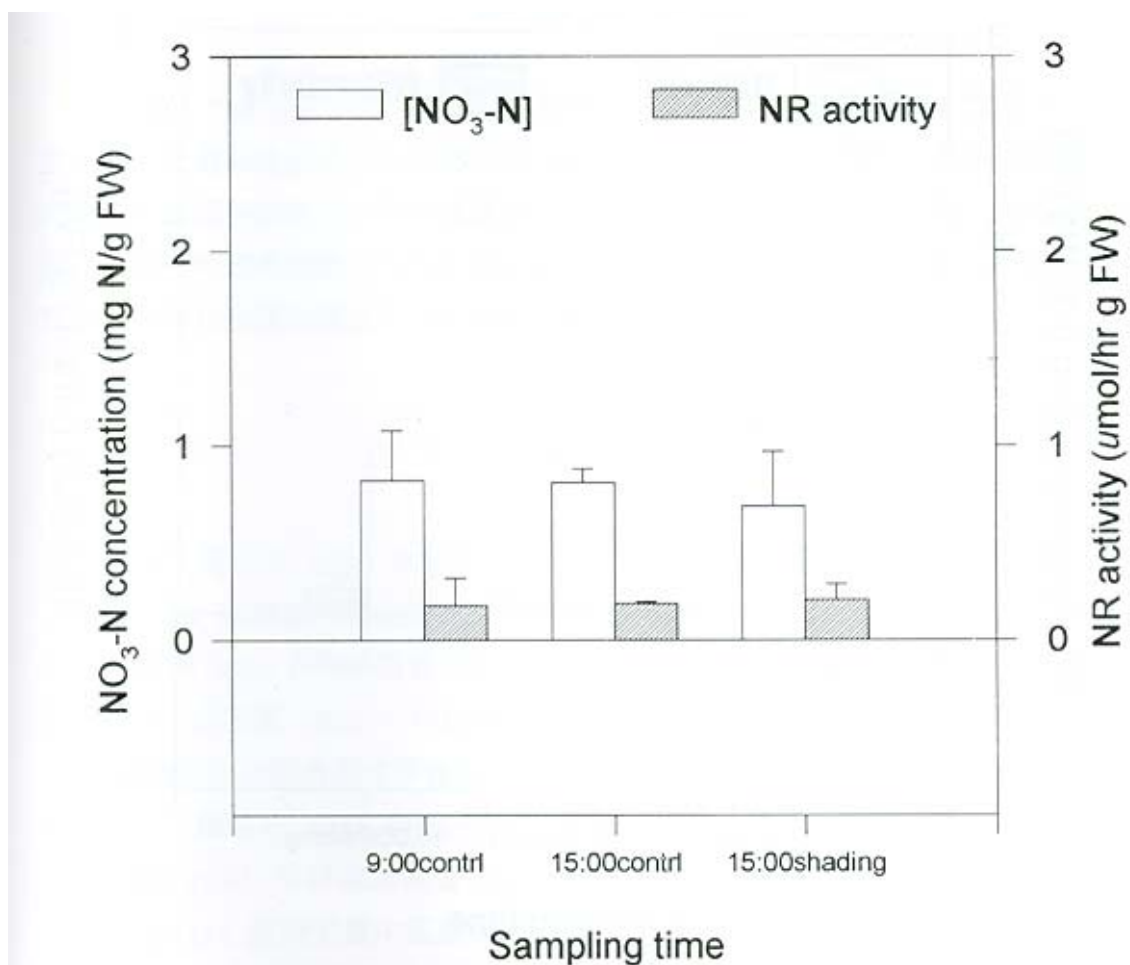
Fig.6. Effect of time and shading on NO₃-N concentration and nitrate reductase activity in blades of kale at 30/25°C (day/night)

二、芥藍菜硝酸還原酵素活性

在低溫栽培環境下 20 / 15 (日 / 夜)，遮陰處理顯著降低葉片之硝酸還原酵素活性，但是硝酸態氮濃度則較對照組低 (圖五)，推測光照下雖使硝酸還原酵素活性提高，同時也促進其硝酸態氮之吸收；高溫栽培環境下 30 / 25 (日 / 夜)，遮陰處理對硝酸還原酵素活性影響不顯著，但與低溫栽培環境下同樣顯著降低葉片中硝酸態氮之濃度 (圖六)。無論在高或低溫栽培環境下，採收時間和遮陰處理對葉柄中硝酸還原酵素活性和硝酸態氮濃度皆無顯著之影響 (圖七及圖八)。

芥藍菜葉片中之硝酸還原酵素活性約是葉柄和莖中之十倍，硝酸態氮濃度約為葉柄和莖之二分之一 (鮮重)；乾物比例約為葉柄之二倍，莖之 1.2 倍。

結論與建議



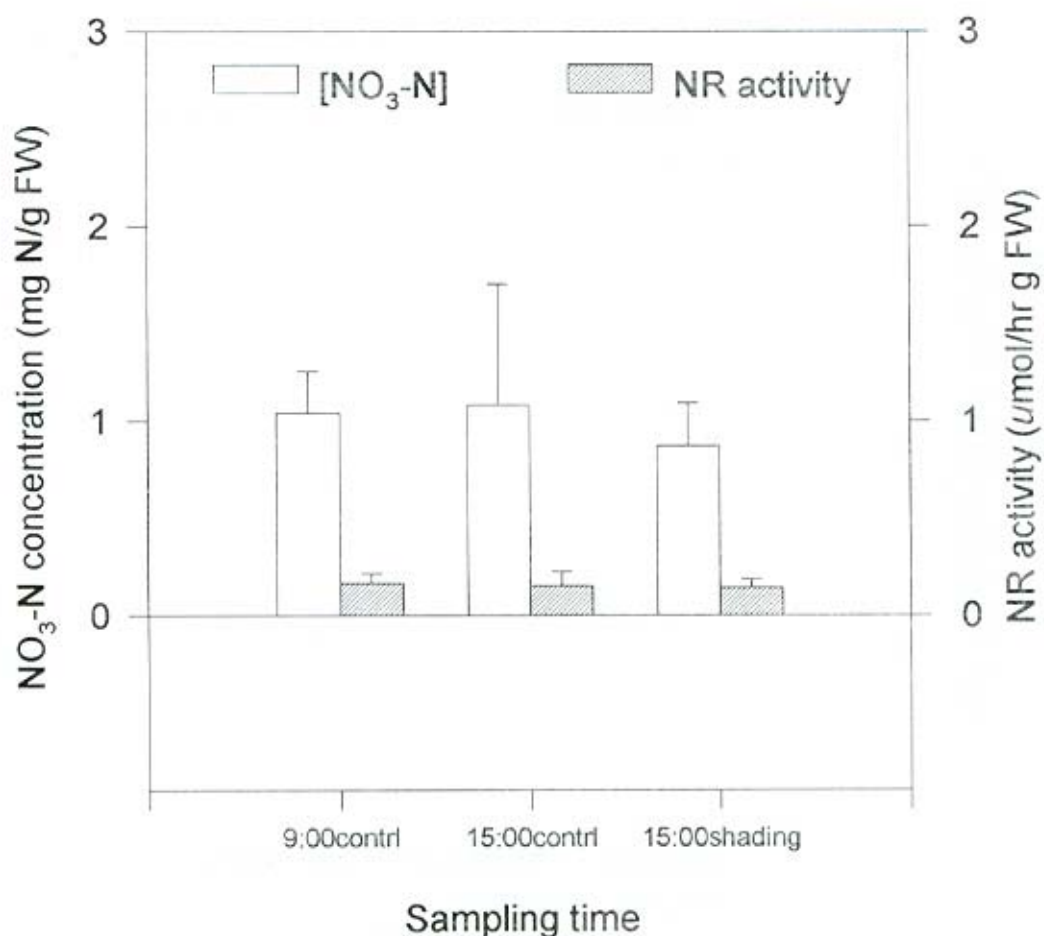
圖七、不同時間和遮陰處理對芥藍菜葉柄中硝酸態氮濃度及硝酸還原酵素活性之影響
20/15°C (日/夜)

Fig.7. Effect of time and shading on NO₃-N concentration and nitrate reductase activity in petioles of kale at 20/15°C (day/night)

以含有 7mM NO₃⁻與 1mM NH₄⁺水耕液栽培芥藍菜之結果顯示全株葉片、葉柄、莖與根部之還原態氮濃度隨採收時間及遮陰處理均無顯著之變化，停用硝酸態氮處理可降低芥藍菜各部位之硝酸態氮濃度。以上提供吾人在食用芥藍菜時之選擇參考，尤其是兒童，可選擇硝酸態氮濃度低的葉片部位食用，不但可減低亞硝酸根離子中毒的危險，因葉片中還原態氮的濃度較高，也較具營養價值。

參考文獻

1. 王銀波、吳正宗 1992 水耕養液中的氮素問題 養液栽培技術講習會專刊 第四輯 pp.15-27 省農試所鳳山熱帶園藝試驗分所出版。
2. 池田英男 1986 作物的營養特性からみた培養液管理 農業および園藝 61:205-211。



圖八、不同時間和遮陰處理對芥藍菜葉柄中硝酸態氮濃度及硝酸還原酵素活性之影響
30/25°C (日/夜)

Fig.8. Effect of time and shading on NO₃-N concentration and nitrate reductase activity in petioles of kale at 30/25°C (day/night)

3. 吳正宗、王銀波 1995 一些影響小白菜(*Brassica chinensis* L.)硝酸態氮含量的環境因子中國農業化學會誌 33:125-133。
4. 林學正、陳淑玲 1986 鋅粉對硝酸還原的影響 台灣大學農業化學系學士論文。
5. 高德錚 1991 水耕蔬菜品質之研究 動態浮根式水耕系統之開發與利用 第六篇 pp.151-171 臺灣省臺中區農改場出版。
6. 倪禮豐 1995 有機質肥料及採收時間對青梗白菜及芥藍菜氮組成的影響 台灣大學農業化學研究所碩士論文。
7. 臺灣農業年報 1993 臺灣省政府農林廳。
8. 蔡素蕙、楊秋忠、黃山內 1989 小白菜及芥藍菜不同部位氮素累積量及遮陰與烹調之影響 中華農學會報 146:34-41。

- 9.蔡素蕙、楊秋忠、黃山內 1989 不同氮肥及貯藏對青梗白菜無機氮含量之影響 中華農學會報 148:36-46.
- 10.篠原溫 1986 養液栽培野菜の品質と栽培技術による改善 農業および園藝 61:219-222。
- 11.Campbell, W. H. and J. Smarrelli, Jr. 1978. Purification and kinetics of higher plant NADH: nitrate reductase. *Plant Physiol.*, 61:611-616.
- 12.Johnson, C. M., P. T. Stout, T. C. Broyer and A. B. Carlton.: 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil*, 8:337-353.
- 13.Maynard, D.N., A.V. Barker, P.L. Minotti and N.H. peck. 1970. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. Agron.*, 28:71-118.
- 14.Nicholas, J.C., J.E. Harper and R.H. Hageman. 1976. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* [L.] Merr.) . Energy limitations. *Plant Physiol.*, 58:736-739.
- 15.Rufty, T.W. Jr., R.J. Volk, P.R. McClure, D.W. Israel and C.D. Raper, Jr. 1982. Relative content of NO_3^- and reduced N in xylem exudates as an indicator of root reduction of concurrently absorbed $^{15}\text{NO}_3^-$. *Plant Physiol.*, 69:166-170.
- 16.Rufty, T.W.Jr., D.W. Israel and R.J. Volk. 1984. Assimilation of $^{15}\text{NO}_3^-$ taken up by plants in the light and the dark. *Plant Physiol.*, 76:769-775.
- 17.Shaner, D.L. and J.S. Boyer. 1976. Nitrate reductase activity in maize(*Zea mays* L.)leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.*, 58:499-504.
- 18.Shaner, D.L. and J.S. Boyer. 1976. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.)leaves. . Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.*, 58:505-509.
- 19.Vogtmann, H., A.T. Temperli, U.Kunsch, M. Eichenberger and P.Ott. 1984. Accumulation of nitrate in leafy vegetable grown under constrasting agricultural system. *Biol. Agric. Hortic.*, 2:51-68.
- 20.Wright, M.J. and K.L. Davison. 1964. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. *Adv. Agron.*, 16:197-247.