

杨永恒,侯孟兰,张 婷,等.甜菊 β -葡萄糖苷酶活性与甜菊糖苷含量变化的研究[J].江苏农业科学,2020,48(11):187-191.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.037

甜菊 β -葡萄糖苷酶活性与甜菊糖苷含量变化的研究

杨永恒,侯孟兰,张 婷,徐晓洋,孙玉明,张永侠,原海燕,黄苏珍

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

摘要:为了研究甜菊 β -葡萄糖苷酶在甜菊糖苷降解代谢中的作用,分别采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)和分光光度计法对甜菊糖苷含量和 β -葡萄糖苷酶活性进行同步检测分析。结果表明,不同甜菊品种中具有高甜菊苷(stevioside,简称 St)含量的中山 5 号、大叶 1 号具有较高的 β -葡萄糖苷酶活性;在中山 5 号开花期植株的不同器官中, β -葡萄糖苷酶活性与甜菊糖苷含量的变化趋势较一致,其中叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性、甜菊糖苷含量均最高,花中次之,茎中较低,根中均最低;中山 5 号 3 个主要生长时期叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性随生长发育的推进而逐渐升高,其甜菊糖苷含量则随生长发育的推进先升后降,现蕾期最高。研究结果可为后续甜菊 β -葡萄糖苷酶及其基因的研究奠定基础。

关键词:甜菊;甜菊糖苷; β -葡萄糖苷酶;分解代谢

中图分类号: S566.901;Q556+.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0187-05

甜菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)别称甜叶菊,是原产于南美洲的菊科(Asteraceae)甜菊属(*Stevia*)宿根性多年生草本植物^[1],因其叶片含有高甜度(高达蔗糖的 250~450 倍)、低热量(低至蔗糖的 1/300)的甜菊糖苷(steviol glycosides)而得名^[2]。甜菊糖苷俗称甜菊糖,目前已经作为天然低热量甜味剂广泛应用于食品、饮料、医药、化工等领域,并且有越来越多的研究发现,甜菊糖苷具有预防和辅助治疗肥胖症、糖尿病、高血压、高血糖以及消炎、抗氧化、抗菌、抗癌和增强免疫力等药用价值^[3]。

甜菊糖苷是以甜菊醇(steviol)为苷元的四环二萜类糖苷,目前已经发现 50 多种甜菊糖苷组分,主要包括甜菊单糖苷(steviolmonoside)、甜菊双糖苷(steviolbioside)、甜菊苷(stevioside,简称 St)、莱鲍迪苷 A(rebaudioside A,简称 RA)、莱鲍迪苷 B(rebaudioside B)、莱鲍迪苷 C(rebaudioside C)、莱鲍迪苷 D(rebaudioside D)、杜尔克苷 A(dulcoside A)等^[4],各种甜菊糖苷组分因其苷元甜菊醇 C13 和 C19 位发生糖基化的糖基种类和数量不同而性质迥

异^[5]。有研究发现,甜菊叶片内甜菊糖苷的积累随生长发育的推进而变化^[6]。由于糖苷积累是合成与分解、糖基化与去糖基化的动态平衡,因此催化糖苷分解的酶[糖苷酶(glycosidases)],尤其是 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidases, EC 3.2.1.21)在甜菊糖苷分解代谢和组分转化中起着相当重要的作用,然而目前在甜菊中尚未见相关报道。 β -葡萄糖苷酶又称 β -D-葡萄糖苷水解酶,可以水解结合于苷元末端非还原性的 β -D-糖苷键,同时释放 β -D-葡萄糖苷和相应配基^[7]。 β -葡萄糖苷酶广泛存在于自然界中,在不同的生物体中, β -葡萄糖苷酶的生物学功能也各不相同。植物来源的 β -葡萄糖苷酶被认为具有较为广泛的生理功能,包括参与植物细胞壁的降解、木质化作用、植物激素的共价激活、宿主防御、香味前体的水解等^[8]。尽管目前已有大量关于 β -葡萄糖苷酶作为植物醇系香味物质产生的关键酶的研究,在人参皂苷^[9]、大豆异黄酮苷^[10]、茶树香叶醇苷^[11]等萜类糖苷降解中的关键作用也有很多报道,然而在以其萜类糖苷而闻名的甜菊中的相关研究很少,目前仅有一些利用微生物来源的 β -葡萄糖苷酶进行甜菊糖苷组分转化^[12]的报道。

为了明确甜菊 β -葡萄糖苷酶在甜菊糖苷降解代谢中的作用,本研究对不同品种、不同器官、不同生长时期甜菊的 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量进行同步测定分析,以期后续甜菊 β -葡萄糖

收稿日期:2019-06-19

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK20160600)。

作者简介:杨永恒(1985—),女,陕西洋县人,博士,助理研究员,主要从事甜菊遗传育种研究。Tel:(025)84347086;E-mail:yyh8576@126.com。

通信作者:徐晓洋,博士,助理研究员,主要从事甜菊遗传育种研究。

Tel:(025)84347086;E-mail:intergoogle@126.com。

苷酶及其基因的研究,以及通过抑制甜菊糖苷的降解从而提高其含量的育种工作等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本试验选择甜菊糖苷总含量和组分种类有差异的 6 个甜菊品种进行试验,供试品种均种植于江苏省中国科学院植物研究所的甜菊资源圃内,各品种的来源及特征见表 1。

表 1 供试甜菊品种的来源及特性

品种	来源	糖苷含量特征
中山 5 号	自主选育	高甜菊苷含量
中山 6 号	自主选育	高莱鲍迪苷 A 含量、高总苷含量
中山 8 号	自主选育	高总苷含量,莱鲍迪苷 A 含量较高
江甜 2 号	国内引种	高莱鲍迪苷 A 含量
守田 3 号	国外引种	莱鲍迪苷 A 含量较高
大叶 1 号	国内引种	高甜菊苷含量

本试验所用主要仪器为 LC-100 高效液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司)、Sapphire C₁₈ 反相色谱柱(苏州赛分科技有限公司,250 mm × 4.6 mm,5 μm)。

1.2 研究方法

1.2.1 取样方法 2016 年 8 月于甜菊现蕾期分别采集 6 个甜菊品种植株顶部的 10 对叶片,每对叶片分为 2 份,1 份用液氮速冻,用于 β-葡萄糖苷酶的提取和酶活性的测定,另 1 份于 105 ℃ 杀青后于 70 ℃ 烘干,用于甜菊糖苷含量的测定。在品种比较的基础上,选择糖苷酶活性最高的品种中山 5 号,分别采集其开花期的根、茎、叶、花序 4 个器官样品,每份样品至少选择 5 株混匀后一分为二,分别用液氮速冻、105 ℃ 杀青后烘干,用于酶活性和糖苷含量的测定。2017 年 5—10 月分别采集中山 5 号快速生长期、现蕾期、开花期的叶片,进行不同生长时期酶活性和糖苷含量的测定,取样方法同上。

1.2.2 甜菊 β-葡萄糖苷酶的提取 参考宋晓青的方法^[13]并略加改进。取 1.0 g 甜菊样品,置于预冷的研钵中,加入约 5 mL pH 值为 7.0 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液、适量石英砂和等量聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone,简称 PVP),在冰上研磨至匀浆后全部转移至 50 mL 离心管中,并用少量 pH 值为 7.0 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液冲洗研钵、研锤 3~4 次,合并洗液至同一 50 mL 离心管中,定容至 20 mL,混匀后于 4 ℃、10 000 g 离心 10 min,

取上清液作为粗酶液。粗酶液用 20%~40% 饱和度的硫酸铵盐析初步纯化后于 4 ℃ 保存备用。

1.2.3 甜菊 β-葡萄糖苷酶活性的测定 (1)对硝基苯酚(*p*-nitrophenol,简称 pNP)标准曲线的绘制。准确称量 139.0 mg pNP,用蒸馏水溶解并定容至 1 000 mL。分别吸取 1、2、3、4、5、6 mL pNP 溶液至 100 mL 容量瓶中,用 1 mol/L Na₂CO₃ 溶液定容并将其混匀,使 pNP 的终浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 μmol/L。以蒸馏水为空白对照,在 410 nm 波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标、pNP 浓度为横坐标,绘制 pNP 标准曲线。β-葡萄糖苷酶活性(U/g)的计算公式如下:

$$\text{酶活性} = \frac{Y \times V_2 \times V}{K \times V_1 \times m \times T}$$

式中:Y 为酶促反应的吸光度;V₂ 为总反应液体积(mL);V 为酶液的总提取量(mL);K 为对硝基苯酚标准曲线的斜率;V₁ 为反应体系中的酶液体积(mL);m 为试样质量(g);T 为反应时间(min)。

(2)甜菊 β-葡萄糖苷酶活性的测定。参考金璐等的研究方法^[14],在同一试管中分别加入 600 μL “1.2.2”节的酶液、200 μL pH 值 7.0 的磷酸缓冲液和 200 μL 10 mmol/L 对硝基苯酚-β-D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside,简称 pNPG),混匀后置于 37 ℃ 的恒温水浴锅内反应 1 h。反应结束后,加入 2 mL 1 mol/L Na₂CO₃ 终止反应。反应液于 4 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,于 410 nm 波长处进行比色,对加热失活的酶液进行同样处理作为空白对照。根据标准曲线计算各样品 β-葡萄糖苷酶的活性。

1.2.4 甜菊糖苷含量的测定 分别取各烘干样品,于研钵中磨成均匀的细粉,准确称取 0.200 g 粉末置于 15 mL 离心管中,再加入 10 mL 蒸馏水,于沸水浴中提取 2 h,然后于 4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,使用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤后,按照 GB 8270—2014《食品安全国家标准 食品添加剂

甜菊糖苷》中的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)测定和计算各样品中甜菊苷、莱鲍迪苷 A 和以 9 种组分计的总甜菊糖苷含量。流动相中 V_{乙醇}:V_{磷酸钠缓冲液} = 32:68;流速为 1.0 mL/min,检测波长为 210 nm,进样量为 20 μL,柱温为 40 ℃。

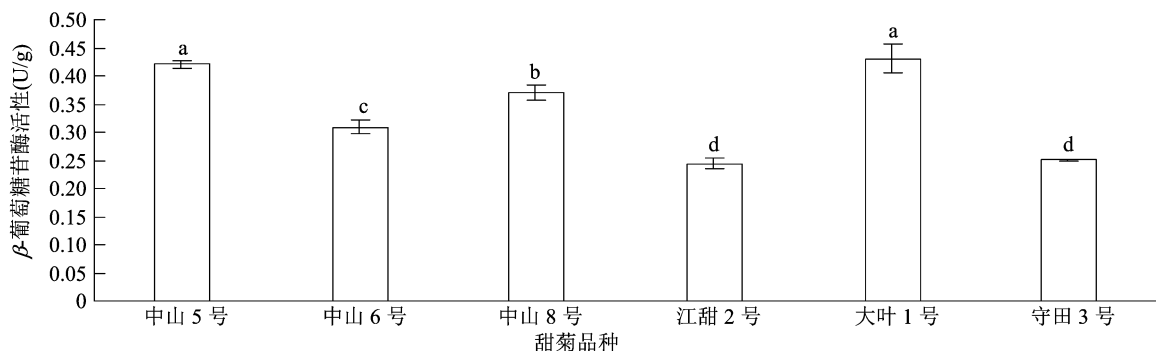
1.2.5 数据处理 本研究中所有试验均设 3 次重复,用 SPSS 17.0 和 Excel 2007 进行数据分析和图

表绘制。

2 结果与分析

2.1 不同甜菊品种叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量

如图 1 所示,在相同生长条件下,不同品种甜菊



标有不同小写字母的代表具有显著差异($P < 0.05$)。下同

图1 不同甜菊品种叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性

如图 2 所示,中山 5 号、大叶 1 号甜菊均为高甜菊苷品种,其甜菊苷含量占总苷含量的比例大于 90%;中山 6 号、江甜 2 号为高莱鲍迪苷 A 品种,莱鲍迪苷 A 含量占总苷含量的比例均大于 80%;中山 6 号、中山 8 号的总苷含量较高,占干叶质量的比例均大于 15%。

同步分析各品种甜菊叶片的 β -葡萄糖苷酶活

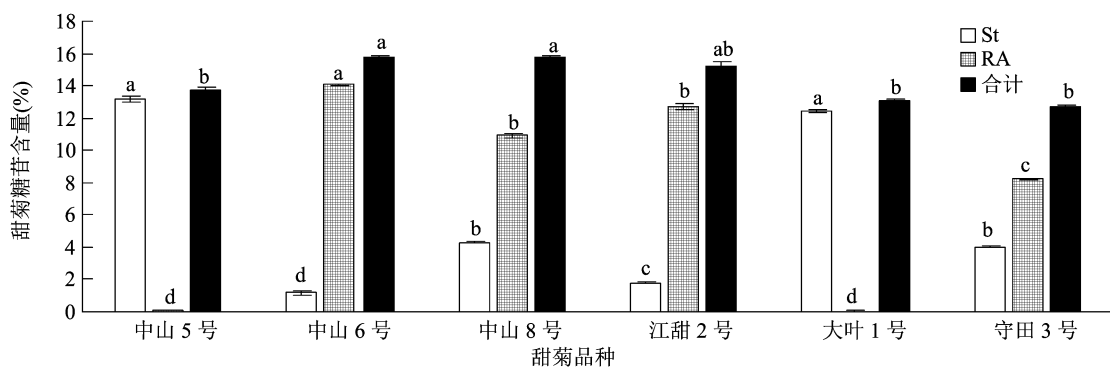


图2 不同甜菊品种叶片中的甜菊糖苷含量

2.2 中山 5 号甜菊不同器官中的 β -葡萄糖苷酶活性、甜菊糖苷含量

如图 3 所示,中山 5 号甜菊叶片、花中的 β -葡萄糖苷酶活性较高,分别为 0.56、0.55 U/g;茎中次之,为 0.48 U/g;根中最低,仅为 0.33 U/g。

由图 4 看出,中山 5 号甜菊叶片中甜菊糖苷含量最高,约占叶干质量的 13.45%;花中较低,占花干质量的 4.24%;茎中含少量糖苷,约占茎干质量的 0.59%;根中甜菊糖苷含量最低,仅占根干质量的 0.12%。

植株现蕾期叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性存在显著差异,其中中山 5 号、大叶 1 号的酶活性较高,分别为 0.42、0.43 U/g,中山 8 号的酶活性也较高,为 0.37 U/g,中山 6 号的酶活性较低,为 0.31 U/g,而守田 3 号、江甜 2 号的酶活性较其他品种偏低,分别为 0.25、0.24 U/g。

性、甜菊糖苷含量发现,高甜菊苷品种中山 5 号、大叶 1 号均具有较高的 β -葡萄糖苷酶活性。由于目前关于甜菊糖苷生物合成途径的研究已经明确,甜菊苷作为前体经糖基转移酶的催化进一步合成莱鲍迪苷 A 及其他糖苷组分,而莱鲍迪苷 A 水解掉 1 个糖基即生成甜菊苷,因此不同甜菊品种的甜菊糖苷组分种类与含量差异可能与其 β -葡萄糖苷酶活性的差异有关。

同步分析可知,中山 5 号甜菊的不同器官中 β -葡萄糖苷酶活性、甜菊糖苷含量具有相似趋势,其花序中较高的 β -葡萄糖苷酶活性可能与花中有较多 β -葡萄糖苷酶参与香气成分的释放有关。

2.3 不同生长时期中山 5 号甜菊叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量

对中山 5 号甜菊快速生长期、现蕾期、开花期叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性进行测定,如图 5 所示,快速生长期甜菊叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性为 0.15 U/g,现蕾期甜菊叶片中的 β -葡萄糖苷酶活

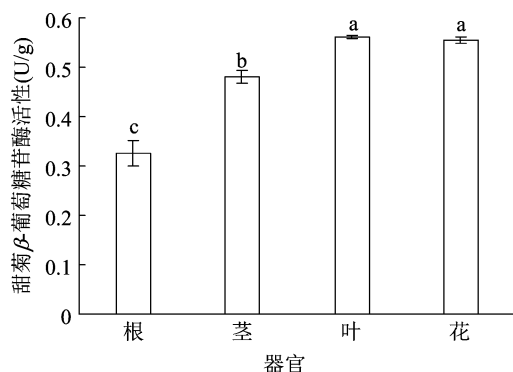
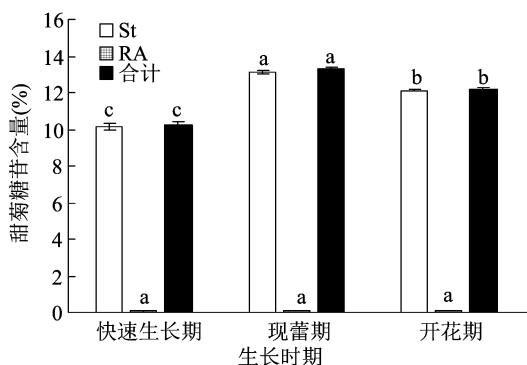
图3 中山 5 号甜菊不同器官中的 β -葡萄糖苷酶活性

图6 不同生长时期中山 5 号甜菊叶片中的甜菊糖苷含量

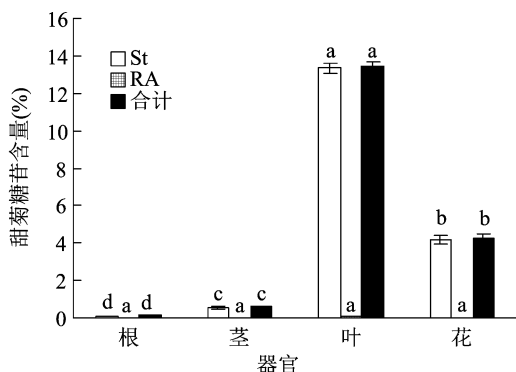
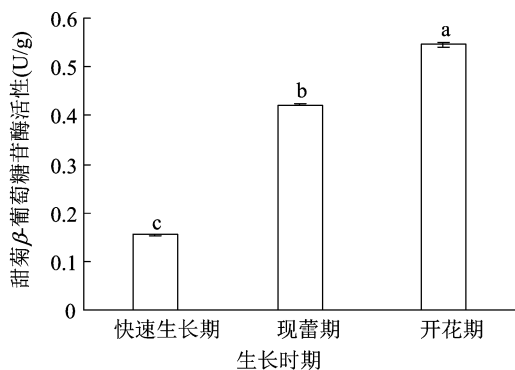


图4 中山 5 号甜菊不同器官中的甜菊糖苷含量

图5 不同生长时期中山 5 号甜菊叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性

性为 0.42 U/g,开花期甜菊叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性为 0.55 U/g。可见随着甜菊的生长,其叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性逐渐增强。

由图 6 可以看出,3 个生长时期甜菊叶片中的糖苷含量同样存在差异,其中快速生长期总苷含量约占干质量的 10.21%;现蕾期糖苷含量最高,约占干质量的 13.26%;开花期的糖苷含量略有下降,约占干质量的 12.21%。开花期甜菊叶片中的甜菊糖苷含量下降, β -葡萄糖苷酶活性升高,表明两者之间存在负相关,而快速生长期甜菊叶片中的糖苷含量和酶活性都较低的原因可能是植株处于旺盛生长期,次生代谢产物刚刚开始积累,参与分解代谢的 β -葡萄糖苷酶在该时期的活动较少。

3 讨论与结论

3.1 不同品种甜菊叶片中 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量的差异

本研究选用的 6 个甜菊品种分别为 2 个高甜菊苷含量品种、2 个高莱鲍迪苷 A 含量品种和 2 个中间类型品种。甜菊苷通常是较原始甜菊品种中的主要组分,因其具有后苦味而被淘汰,莱鲍迪苷 A 等组分因具有更高的甜度和更佳的味质而倍受人们欢迎。在甜菊糖苷生物合成途径中甜菊苷是莱鲍迪苷 A 及其他糖苷组分的前体物质,莱鲍迪苷 A 水解掉 1 个葡萄糖基即生成甜菊苷。Nakano 等早在 1998 年就研究发现,微生物来源的 β -葡萄糖苷酶可参与甜菊糖苷的水解,可使甜菊苷水解成甜菊双糖苷,同时还能将莱鲍迪苷 A 水解成莱鲍迪苷 B^[15-16]。本研究结果表明,不同糖苷含量类型的甜菊植株现蕾期叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性存在显著差异,其中高甜菊糖苷品种中山 5 号、大叶 1 号均具有较高的 β -葡萄糖苷酶活性。因此,不同品种的甜菊糖苷组分种类和含量差异可能与其 β -葡萄糖苷酶的功能差异有关,这为后续筛选甜菊糖苷特异的 β -葡萄糖苷酶活性低的种质用于选育高糖苷积累的新品种奠定了理论基础。

3.2 甜菊不同器官中 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量的分析

在甜菊中山 5 号开花期植株的不同器官中, β -葡萄糖苷酶活性与甜菊糖苷含量的变化趋势较一致,其中叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量均最高,花中次之,茎中较低,根中均为最低。花中的 β -葡萄糖苷酶活性与叶片中的 β -葡萄糖苷酶活性非常接近,可能与花中有较多 β -葡萄糖苷酶参与香气成分的释放有关。植物的香味物质通常以糖苷形式储存,在水解酶作用下逐步释

放^[17],因此 β -葡萄糖苷酶在花^[13,18-20]、果^[21-23]、茶^[11,24-26]增香中的应用多有报道。

3.3 甜菊不同生长时期叶片中 β -葡萄糖苷酶活性和甜菊糖苷含量的分析

对甜菊中山 5 号 3 个主要生长时期叶片中 β -葡萄糖苷酶活性的检测结果表明, β -葡萄糖苷酶活性随生长发育的推进逐渐升高,这与钟娴发现的平潭水仙中 β -葡萄糖苷酶的活性随水仙花的生长逐渐升高的结果一致^[27]。甜菊糖苷含量随生长发育的推进先升后降,在现蕾期达到最高值,这可能因为快速生长期植株处于旺盛生长阶段,次生代谢产物刚刚开始积累,同时参与分解代谢的 β -葡萄糖苷酶在该时期活动较少;而开花期甜菊叶片开始衰老,分解代谢较为旺盛,使其甜菊糖苷含量逐渐降低。

综上所述,在甜菊不同品种间,以及相同品种的不同器官和不同生长发育时期, β -葡萄糖苷酶活性都存在显著差异,并且与甜菊糖苷含量有一定相关性。作为甜菊 β -葡萄糖苷酶的初步研究结果,本研究得出, β -葡萄糖苷酶参与甜菊糖苷分解代谢,可为今后甜菊中 β -葡萄糖苷酶及其基因的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Madan S, Ahmad S, Singh G N, et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - a review [J]. Indian Journal of Natural Products & Resources, 2010, 1(3): 267-286.
- [2] 舒世珍. 甜菊引种三十年[J]. 中国种业, 2010(6): 21-23.
- [3] Lemus - Mondaca R, Vega - Gálvez A, Zura - Bravo L, et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high - potency natural sweetener; a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects[J]. Food Chemistry, 2012, 132(3): 1121-1132.
- [4] Chaturvedula P V S, Upreti M, Prakash I. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*[J]. Molecules, 2011, 16(5): 3552-3562.
- [5] Richman A, Swanson A, Humphrey T, et al. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*[J]. The Plant Journal, 2005, 41(1): 56-67.
- [6] Yang Y, Huang S Z, Han Y L, et al. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 86: 174-180.
- [7] Cairns J R K, Esen A. β -glucosidases [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(20): 3389-3405.
- [8] Cairns J R K, Mahong B, Baiya S, et al. β -glucosidases: multitasking, moonlighting or simply misunderstood? [J]. Plant Science, 2015, 241: S0168945215300984.
- [9] Xie J C, Zhao D X, Zhao L G, et al. Overexpression and

characterization of a Ca^{2+} activated thermostable β -glucosidase with high ginsenoside Rb1 to ginsenoside 20 (S) - Rg3 bioconversion productivity[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(6): 839-850.

- [10] Falcão G H, Handa C L, Silva M B R, et al. Soybean ultrasound pre-treatment prior to soaking affects β -glucosidase activity, isoflavone profile and soaking time[J]. Food Chemistry, 2018, 269: 404-412.
- [11] 林郑和, 钟秋生, 陈常颂, 等. 不同香型茶树鲜叶挥发性组分与 β -葡萄糖苷酶的相关性分析[J]. 植物学报, 2015, 50(6): 713-720.
- [12] 万会达. 甜菊苷的酶促糖基化和水解反应研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [13] 宋晓青. 蜡梅花 β -葡萄糖苷酶的活性分析、分离纯化与性质的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [14] 金璐, 王彦, 薛芸, 等. 植物源 β -葡萄糖苷酶活性检测方法学研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(26): 5032-5037.
- [15] Okamoto K, Nakano H, Yatake T, et al. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Flavobacterium johnsonae*[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2000, 64(2): 333-340.
- [16] Nakano H, Okamoto K, Yatake T, et al. Purification and characterization of a novel β -glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85(2): 162-168.
- [17] 李远华. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 421-425.
- [18] 董尚胜, 钱利生, 童启庆. 窖茶用栀子花中糖苷酶活性与醇类香气研究[J]. 茶叶科学, 2002, 22(1): 25-29.
- [19] 左亚锋, 张伟, 吴德玲, 等. 毫菊花中 β -葡萄糖苷酶的提取和酶学性质研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(5): 83-86.
- [20] 董尚胜, 童启庆, 渡边修治, 等. 茉莉花粗酶液提取条件对 β -D-葡萄糖苷酶活性的影响[J]. 中国茶叶加工, 1997(2): 32-33.
- [21] 何芒芒. 柑橘中糖苷香气前体物质及 β -葡萄糖苷酶活性变化相关性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [22] 段朝瑞, 陈佩, 张国军, 等. 葡萄成熟过程中生理特征与 β -葡萄糖苷酶基因的表达分析[J]. 中国农业大学学报, 2013, 18(2): 50-55.
- [23] 詹萍, 田洪磊, 杜娟. 库尔勒香梨中 β -葡萄糖苷酶活的测定及不同贮藏条件下活性变化的研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(11): 1104-1107.
- [24] 吴乔. 乌龙茶做青对 β -葡萄糖苷酶活性及酶学性质的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [25] 骆耀平, 董尚胜, 童启庆, 等. 7 个茶树品种新梢生育过程中 β -葡萄糖苷酶活性变化[J]. 茶叶科学, 1997(增刊 1): 25-28.
- [26] 周汉琛, 雷攀登, 丁勇. 茶树 β -葡萄糖苷酶研究进展[J]. 茶叶科学, 2016, 36(2): 111-118.
- [27] 钟娴. ‘平潭水仙’ β -葡萄糖苷酶与挥发性芳香物质形成关系的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.