

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (10) :1155 - 1160; 4 October 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.007

Aspergillus flavus F52 菌株鉴定及不同碳源对曲酸产量的影响

魏少鹏, 徐楠, 姬志勤*

西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 【目的】探明豇豆内生真菌 F52 的分类地位及不同碳源对曲酸产量的影响。【方法】采用形态观察及 ITS 序列分析对豇豆内生真菌 F52 进行分类鉴定;通过重结晶获得曲酸高纯度产物,采用核磁共振波谱、高分辨质谱及红外光谱对其进行结构鉴定;采用高效液相色谱检测不同碳源对曲酸产量的影响。【结果】该曲酸产生菌为黄曲霉 *Aspergillus flavus* F52;葡萄糖与蔗糖组成的复合碳源曲酸产量最高,乳糖的存在不利于曲酸的生成;该菌株发酵液中曲酸含量可达 24.44 g/L。【结论】*Aspergillus flavus* F52 是一株具有产业化开发价值的曲酸高产菌株。

关键词: *Aspergillus flavus* F52, 曲酸, 碳源

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1155-06

曲酸 (Kojic acid), 化学名 5-羟基-2-羟甲基-4, 4-吡喃酮, 是曲霉属和青霉属多种真菌好氧发酵产生的弱酸性次级代谢物^[1]。曲酸及其衍生物具有抗菌菌^[2-5]、抗真菌^[6-9]、抗病毒^[10]、抑制酪氨酸酶^[11]、抗氧化^[12]等多种生物活性。日本在 1998 年已批准曲酸作为保鲜剂和增白剂用于食品及日用化妆品^[13], 此外, 曲酸还是生产头孢类抗生素以及食品增香剂麦芽酚的中间体^[14]。随着研究的深入, 曲酸的应用范围仍在继续拓展。目前, 微生物发酵仍是工业化生产曲酸的唯一途径, 因此, 筛选曲酸高产菌株在生产中具有重要的应用价值。

在筛选天然抗生素过程中, 本课题组从豇豆 (*Vigna unguiculata*) 中分离到一株真菌 (编号: F52)。该菌株发酵液对革兰氏阳性细菌仅具微弱的抑菌活性, 但其次级代谢物不仅产量很大, 且非常容易结晶。课题组采用波谱学方法鉴定该成分为曲酸, 同时根据形态特征及 ITS 序列分析对其产生菌

的分类地位进行了系统研究, 鉴定其属于黄曲霉, 命名为 *Aspergillus flavus* F52。本文研究了不同碳源对曲酸产量的影响, 证实 *A. flavus* F52 为曲酸高产菌株, 具有重要的应用价值。现将主要研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: F52, 2012 年 8 月自一株豇豆果实中分离, 由西北农林科技大学农药研究所保存。

1.1.2 基础培养基: 平板培养基, 马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 15.0 g、蒸馏水 1000 mL, 用于 F52 菌株平板培养; 液体培养基, 马铃薯 200.0 g、蛋白胨 0.5 g、乙酸钠 1.66 g、MgSO₄ 1.02 g、葡萄糖 10.0 g、蔗糖 10.0 g、蒸馏水 1000 mL, 用于 F52 菌株摇瓶发酵。所有培养基在 121℃, 1 × 10⁵ Pa 下灭菌

基金项目: 国家自然科学基金 (31371973, 31301700), 陕西省自然科学基金 (2013JQ3003), 中央高校基本科研业务费专项 (QN2013009)

* 通信作者。Tel: +86-29-87092191; Fax: +86-29-87093987; E-mail: jizhiqin@nwsuaf.edu.cn

作者简介: 魏少鹏 (1980 -), 男, 陕西礼泉人, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: weishaopeng@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2013-12-11; **修回日期:** 2014-02-22

30 min 备用。

1.1.3 主要试剂及仪器: ZHWY-C2112F 恒温摇床, 上海智诚分析仪器制造有限公司; Bruker APEX II 质谱仪和 Bruker DRX400 核磁共振仪, 德国布鲁克公司; Nicolet FT-IR 750 红外光谱仪, 美国尼高力公司; Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; WPR 熔点仪, 上海精科公司; PCR 仪, Thermo Fisher Scientific; 电泳仪, 北京市六一仪器厂。乙醇、乙酸乙酯等试剂均为市售分析纯产品。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态学鉴定^[15]: 将 F52 菌株接种在 PDA 培养基平板上, 观察菌落形态, 在光学显微镜下观察菌株的菌丝顶囊和孢子形态。

1.2.2 ITS 序列分析鉴定^[16]: 用 E. Z. N. A™ Fungal DNA Mini Kit (OMEGA 公司) 试剂盒提取菌株 F52 基因组 DNA, 根据 ITS 设计特异扩增引物, 上游引物为: ITS1-F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA-3', (22 bp, $T_m = 44.1^\circ\text{C}$), 下游引物为 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', (20 bp, $T_m = 44.6^\circ\text{C}$)。将获得的 PCR 产物送华大基因测序鉴定, 测序结果在 GenBank 中做 Blast 比对分析, 并采用 MEGA5.1 软件构建系统发育树。

1.2.3 PCR 反应体系: 模板 DNA (2.00 μL), Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$, 2.50 μL), Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$, 2.50 μL), 10 \times Ex Taq Buffer (Mg^{2+} free) (5.00 μL), dNTP mixture (10 mmol/L, 1.00 μL), TaKaRa Ex Taq (5 U/ μL , 0.25 μL), MgCl_2 (20 mmol/L, 4.00 μL), ddH₂O (32.75 μL)。

1.2.4 PCR 程序设定为: 95 $^\circ\text{C}$ 5 min, 95 $^\circ\text{C}$ 1 min, 55 $^\circ\text{C}$ 0.5 min, 72 $^\circ\text{C}$ 0.5 min, 30 个循环, 最后一个循环结束后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 菌株发酵

菌株 F52 在 PDA 固体培养基活化后, 接种于装有 100 mL 基础发酵培养液的 250 mL 三角瓶中, 置于控温摇床上于 25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下发酵培养 6 d, 过滤, 得发酵液。

1.4 化合物 XN-01 的分离及结构鉴定

取 5.0 L 发酵液, 用双层纱布过滤除去菌丝体, 滤液用等量乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩回收溶剂, 将浓缩物溶于适量热水 (约 80 $^\circ\text{C}$), 趁热过滤后将滤液至冰水中析晶, 经反复重结晶后得无色针状固体 XN-01。采用高分辨质谱、核磁共振谱以及红外光

谱技术对其进行结构鉴定。

1.5 碳源对曲酸产量的影响

1.5.1 单一碳源发酵曲酸产量比较: 将基础发酵培养基中的葡萄糖和蔗糖更换为单一碳源 (葡萄糖、蔗糖、乳糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、麦芽糖、D-半乳糖、D-果糖), 摇瓶发酵 6 d, 发酵液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 法检测曲酸产量。

1.5.2 复合碳源发酵曲酸产量比较: 由葡萄糖与其他单糖或二糖以不同比例组成复合碳源, 摇瓶发酵后测定曲酸产量。

1.5.3 发酵时间对曲酸产量的影响: 确定了最佳发酵培养基后, 通过摇瓶发酵, 从第 4 d 开始每隔 24 h 取样检测, 考察不同时间点曲酸产量的变化。

1.5.4 HPLC 检测条件: Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 \times 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇 + 0.1% 乙酸 = 5 + 95 (V/V), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 260 nm。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态学鉴定: 菌株 F52 菌落初呈绒状, 亮黄绿色, 比较平坦, 后中心微隆, 慢慢变为暗绿色, 菌落表面呈颗粒状, 有放射性同心环形。光学显微镜下观察菌株形态: 菌丝无隔, 顶囊呈椭圆形, 顶囊表面双层小梗, 分生孢子呈光滑球形 (图 1)。

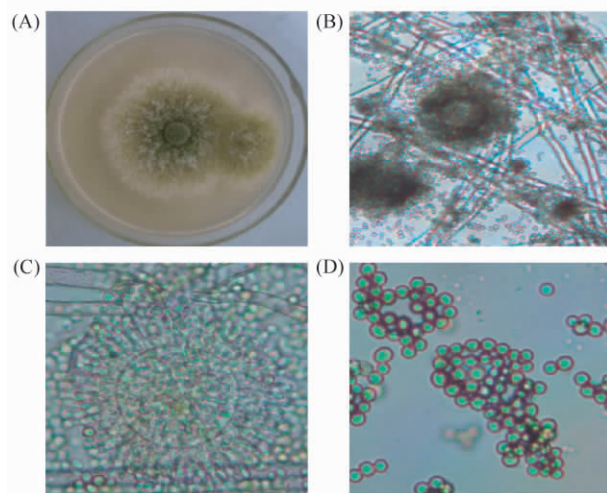


图 1. 菌株 F52 的形态观察

Figure 1. Morphology of strain F52. Growth in PDA (A), mycelium and sporangium ($\times 100$, B), sporangium ($\times 400$, C), conidium ($\times 400$, D)

2.1.2 ITS 序列分析鉴定: 将菌株 F52 的 ITS 序列上传至 NCBI GenBank, 获得登记号 KF574925, 经 BLAST 分析, 选取了相似度高的 20 个序列通过

MEGA5.1 软件进行系统发育树的构建^[17] (图 2)。通过系统发育树判定该菌株为子囊菌门, 丝孢菌纲, 丛梗孢目, 丛梗孢科, 曲霉属, 黄曲霉。

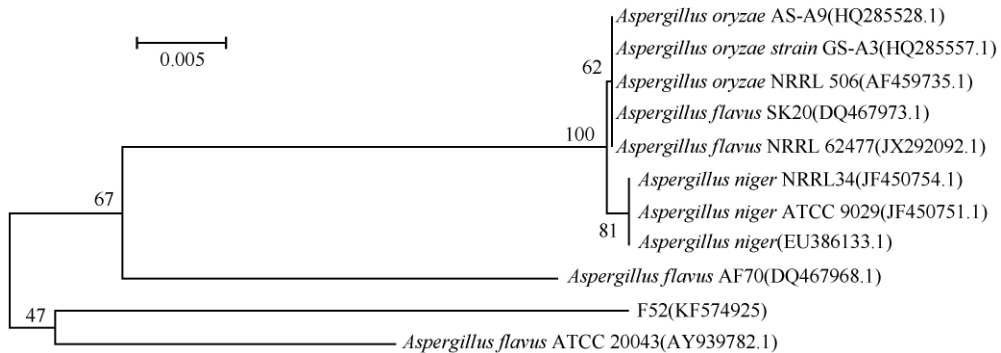


图 2. 菌株 F52 ITS 基因序列构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree of *Aspergillus flavus* based on ITS gene sequence of strain F52. F52 refers to the stain isolated. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.5% sequence divergence.

2.2 化合物结构鉴定

XN-01, 白色或微白色结晶。熔点: 151.2 - 152.3°C, 文献值: 151.5 - 152.3°C; IR (KBr) ν_{\max} 1077, 1482, 1600, 1625, 1700, 2927, 3200 cm^{-1} ; 高分辨质谱 (电喷雾, 正离子模式) 可观测到准分子离子峰 m/z 143.0342 (计算值 $\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$, 143.0344)。¹H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 4.41 (2H, s, H-7), 6.50 (1H, s, H-5), 7.94 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 59.82 (C-7), 109.39 (C-5), 139.60 (C-2), 145.98 (C-6), 169.01 (C-3), 175.49 (C-4)。对比文献中的相关

理化数据, 最终确定化合物 XN-01 为曲酸 (图 3)。

2.3 不同碳源对曲酸产量的影响

2.3.1 单一碳源对曲酸产量的影响: 单一碳源对曲酸产量的影响见表 1, 由表 1 可以看出, 基础发酵培养基 (葡萄糖 10 g/L + 蔗糖 10 g/L) 发酵产物中曲酸产量为 3.98 g/L, 而添加单一碳源 (10 g/L) 后曲酸产量均在 1.0 g/L 以下, 但不同碳源之间有明显差异, 添加葡萄糖的处理曲酸产量最高, 添加麦芽糖的处理曲酸产量较低, 而添加乳糖的处理未检测到曲酸。

表 1. 单一碳源对曲酸产量的影响

Table 1. Influence of carbon sources on the production of kojic acid (g/L, Avg \pm SD)

maltose	D-xylose	D-fructose	glucose	sucrose	D-galactose	L-arabinose	lactose	basal medium
0.06 \pm 0.01	0.37 \pm 0.01	0.38 \pm 0.02	0.74 \pm 0.01	0.49 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	-	3.98 \pm 0.11

2.3.2 复合碳源对曲酸产量的影响: 以葡萄糖作为基础碳源, 分别与 D-木糖、D-果糖、蔗糖和乳糖组成复合碳源, 各复合碳源对曲酸产量的影响见表 2。由表 2 可以看出, 同等条件下葡萄糖和蔗糖组合的曲酸产量均高于其他复合碳源的处理, 而葡萄糖和乳糖组成的复合碳源曲酸产量均明显低于其他处理。

各处理曲酸产量的差异, 其结果见表 3。从正交实验结果可以看出, 葡萄糖与蔗糖组合 3 (葡萄糖 20 g/L + 蔗糖 30 g/L) 和 6 (葡萄糖 20 g/L + 蔗糖 40 g/L) 中曲酸产量最高, 分别为 14.22 g/L 和 14.24 g/L。因此, 最终确定培养基为土豆 200 g/L、蛋白胨 0.5 g/L、乙酸钠 1.66 g/L、 MgSO_4 1.02 g/L、葡萄糖 20 g/L、蔗糖 30 g/L。

以不同比例葡萄糖与蔗糖组成复合碳源, 考察

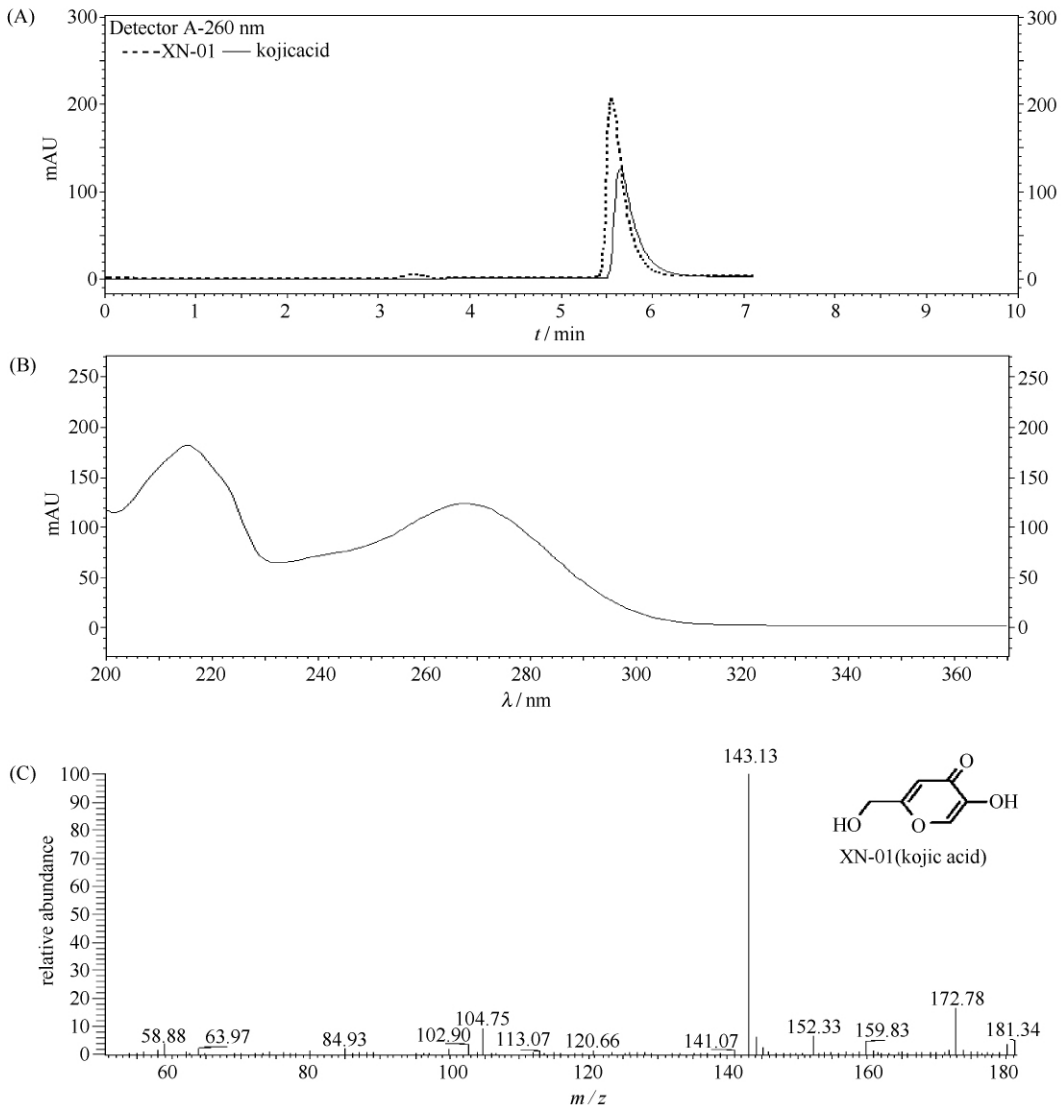


图 3. 化合物 XN-01 的高效液相色谱 (A)、紫外光谱 (B) 和质谱图 (C)

Figure 3. Spectra of HPLC (A), UV (B) and ESI/MS (C) for compound XN-01.

表 2. 复合碳源对曲酸产量的影响

Table 2. Influence of complex carbon sources on the production of kojic acid (g/L, Avg ± SD)

<i>c</i> / (carbon sources) / (g/L)	<i>c</i> / (glucose) / (5.0 g/L)				<i>c</i> / (glucose) / (10.0 g/L)			
	D-fructose	D-xylose	lactose	sucrose	D-fructose	D-xylose	lactose	sucrose
5.0	0.24 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.42 ± 0.01	1.19 ± 0.03	1.45 ± 0.04	0.36 ± 0.02	2.86 ± 0.05
10.0	1.85 ± 0.03	2.45 ± 0.01	0.07 ± 0.01	2.99 ± 0.11	3.28 ± 0.05	3.57 ± 0.05	0.54 ± 0.01	3.84 ± 0.10
20.0	6.05 ± 0.20	5.61 ± 0.15	0.17 ± 0.02	6.68 ± 0.18	8.27 ± 0.15	7.47 ± 0.25	0.72 ± 0.01	8.86 ± 0.33

2.3.3 发酵时间对曲酸产量的影响: 发酵时间对曲酸产量的影响见表 4。由表 4 可以看出, 从 4 d 至 12 d 曲酸产量呈上升趋势, 从 12 d 至 15 d 开始略有下降, 发酵 12 d 达最高含量 24.44 g/L。

3 讨论

(1) 通过对单一碳源发酵产物的液相色谱检测结果进行分析, 可以发现几种单糖或二糖对曲酸产量的影响是非常大的, 其中添加乳糖的处理中未检

测到曲酸,而葡萄糖 + 乳糖组成的复合碳源与单一葡萄糖处理的曲酸产量相近,均远低于其它复合碳源的产量,说明乳糖作碳源不产曲酸。

(2)从文献中可以看到,产曲酸黄曲霉出发菌株的发酵产量一般在 10 g/L 左右,经过菌种诱变后最高可达 20 - 60 g/L^[18-20]。*Aspergillus flavus* F52 菌株经过简单的碳源优化后曲酸产量即可达 24.44 g/L,经过菌种诱变或发酵条件优化后,曲酸产量仍有进一步提高的可能,这说明该菌株是一株具有应用价值的高产菌株。

表 3. 葡萄糖和蔗糖浓度优化

Table 3. Optimization of different concentration of glucose and sucrose

No.	c/(glucose) (g/L)	c/(sucrose) / (g/L)	c/(kojic acid) (g/L, Avg ± SD)
1	10	30	13.39 ± 0.05
2	10	40	13.45 ± 0.18
3	10	50	12.55 ± 0.09
4	10	60	10.95 ± 0.23
5	20	30	14.22 ± 0.33
6	20	40	14.24 ± 0.07
7	20	50	12.70 ± 0.35
8	20	60	11.68 ± 0.20
9	30	30	13.51 ± 0.10
10	30	40	13.20 ± 0.25
11	30	50	11.42 ± 0.05
12	30	60	10.88 ± 0.20
13	40	30	11.72 ± 0.11
14	40	40	11.27 ± 0.15
15	40	50	10.58 ± 0.05
16	40	60	10.10 ± 0.35
Avg T1 (10, 30)	10 (12.59)	30 (13.21)	
Avg T2 (20, 40)	20 (13.21)	40 (13.19)	
Avg T3 (30, 50)	30 (12.25)	50 (12.83)	
Avg T4 (40, 60)	40 (10.92)	60 (10.92)	
range	0.39	1.55	

表 4 不同发酵时间对曲酸含量的影响

Table 4 Influence of fermentation time on kojic acid production

t/d	kojic acid (g/L, Avg ± SD)
4	7.81 ± 0.13
5	10.30 ± 0.15
6	13.99 ± 0.11
7	17.08 ± 0.15
8	18.80 ± 0.17
9	19.69 ± 0.23
10	21.06 ± 0.14
11	22.16 ± 0.32
12	24.44 ± 0.25
13	23.81 ± 0.10
14	23.04 ± 0.17
15	23.04 ± 0.22

参考文献

- [1] Lee LS, Parrish FW, Jacks TJ. Substrate depletion during formation of aflatoxin and kojic acid on corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 1986, 93 (2) : 105-107.
- [2] Takashi K, Itsuo I, Chuji T, Toshio F. Structure-activity study of bacteriostatic kojic acid analogs. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1975, 39 (6) : 1311-1317.
- [3] Pirsellova K, Balaz S, Sturdik E, Ujhelyova R, Veverka M, Uher M, Brtko J. Quantitative structure-time-activity relationships (QSTAR) : pH-dependent growth inhibition of *Escherichia coli* by ionizable and nonionizable kojic acid derivatives. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 1997, 16 (4) : 283-289.
- [4] Aytemir MD, Özçelik B. Synthesis and biological activities of new Mannich bases of chlorokojic acid derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 2011, 20 (4) : 443-452.
- [5] Emami S, Ghafouri E, Faramarzi MA, Samadi N, Irannejad H, Foroumadi A. Mannich bases of 7-piperazinylquinolones and kojic acid derivatives: Synthesis, *in vitro* antibacterial activity and *in silico* stud. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 68 (c) : 185-191.
- [6] Aytemir MD, Özçelik B, Karakaya G. Evaluation of bioactivities of chlorokojic acid derivatives against dermatophytes couplet with cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23 (12) : 3646-3649.
- [7] Soo MA, Ho SR, Heung SB, Yung HJ, Yong DH, Song SS, Young-Ho P, Soo NP. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011, 21 (24) : 7466-7469.
- [8] Hiroshi K, Norihisa S, Koji TA, Hideo M, Takashi K, Itsuo I. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1990, 54 (9) : 2441-2442.
- [9] Baláz S, Uher M, Brtko J, Veverka M, Bransová J, Dobias J, Pózdová M, Buchvald J. Relationship between antifungal activity and hydrophobicity of kojic acid derivatives. *Folia Microbiol (Praha)*, 1993, 38 (5) : 387-391.
- [10] Aytemir MD, Özçelik B. A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45 (9) : 4089-4095.

- [11] Rho HS, Lee CS, Ahn SM, Hong YD, Shin SS, Park YH, Park SN. Studies on tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of benzoic acid derivatives containing kojic acid moiety. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2011, 32 (12) : 4411-4414.
- [12] Mithun R, Niyada H, Bridget D, Dana VF, James FB, Ajit GT, Jesse A, Camilo R, Barbara SS, Takashi T. Synthesis of kojic acid derivatives as secondary binding site probes of D-amino acid oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23 (13) : 3910-3913.
- [13] Jiang LY, Lan SL. Research progress of kojic acid production and utilization. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40 (21) : 11059-11063. (in Chinese)
蒋利亚, 兰时乐. 曲酸生产与利用的研究进展. *安徽农业科学*, 2012, 40 (21) : 11059-11063.
- [14] Zhu XR, Kang JP. Current research and producing of kojic acid and its applying in food and cosmetics industry. *Sichuan Food and Fermentation*. 2002, 38 (1) : 26-29. (in Chinese)
朱秀容, 康建平. 曲酸的生产现状及其在食品与日化工业的应用. *四川食品与发酵*. 2002, 38 (1) : 26-29.
- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [16] Manter DK, Vivanco JM. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71 (1) : 7-14.
- [17] Barry GH. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30 (5) : 1229-1235.
- [18] Pei JS. Selection of kojic acid producing strains and optimization of the fermentation condition. *Food and Fermentation Industries*, 1997, 23 (1) : 11-14. (in Chinese)
裴疆森. 曲酸生产菌种的筛选和发酵培养条件的优化. *食品与发酵工业*, 1997, 23 (1) : 11-14.
- [19] Shen WR, Shen J, Han LP, Jiang Y, Wan Y, Chen R. Compound mutation breeding of kojic acid production strain. *Microbiology*, 2003, 30 (4) : 60-64. (in Chinese)
沈卫荣, 沈俭, 韩丽萍, 江莹, 万一, 陈锐. 曲酸生产菌的复合诱变选育. *微生物学通报*, 2003, 30 (4) : 60-64.
- [20] Zhao X, Zhao J, Wu SG, Hu CM, Zhao ZB. Mutagenesis of strain with high yield of kojic acid. *Acta Laser Biology Sinica*, 2010, 19 (4) : 542-545. (in Chinese)
赵鑫, 赵金, 吴思国, 胡翠敏, 赵宗保. 曲酸高产菌株的诱变选育. *激光生物学报*, 2010, 19 (4) : 542-545.

Identification of a kojic-acid producing *Aspergillus flavus* F52

Shaopeng Wei, Nan Xu, Zhiqin Ji*

College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

Abstract: [Objective] We identified an endophytic fungus of *Vigna unguiculata*, as well as the influence of carbon sources on the production of kojic acid by the isolated fungus. [Methods] This kojic acid producer was identified as *Aspergillus flavus* F52 according to morphological characteristics and ITS region of rDNA. The metabolite of strain F52 was obtained by recrystallization, and identified as kojic acid based on the spectral data of NMR, HR-ESI/MS and IR. The fungus was cultivated in medium containing various carbon sources, and the production of kojic acid in the fermentation broth was quantified by high performance liquid chromatography. [Results] The complex carbon source which was composed of glucose and sucrose was preferential, whereas the presence of lactose was not beneficial to the production of kojic acid. The content of kojic acid in the fermentation broth reached 24.44 g/L. [Conclusion] *Aspergillus flavus* F52 might be a potent producer of kojic acid for commercial use.

Keywords: *Aspergillus flavus* F52, kojic acid, carbon sources

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371973, 31301700), by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2013JQ3003) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (QN2013009)

* Corresponding author. Tel: +86-29-87092191; Fax: +86-29-87093987; E-mail: jizhiqin@nwsuaf.edu.cn

Received: 11 December 2013 / Revised: 22 February 2014