



融合淀粉酶 AmyP-Clo 对大米生淀粉的高效降解

王静, 翟璐, 张销寒, 李风玲, 肖亚中, 彭惠*

安徽大学生命科学学院, 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230039

摘要:【目的】获得能高效降解大米生淀粉的 α -淀粉酶。【方法】将来源 *Clostridium butyricum* T-7 的 α -淀粉酶的淀粉结合结构域与能快速偏好性降解大米生淀粉的 α -淀粉酶 AmyP 的催化结构域融合重组表达。【结果】融合蛋白 AmyP-Clo 保留了野生型 AmyP 催化优势的基础上, 对大米生淀粉的比活为(373.9 \pm 8.4) U/mg, 4 h 内对 5%大米生淀粉的最终降解率为(42.7 \pm 1.1)%, 对大米生淀粉的最高结合率为(71.1 \pm 1.6)%, 这些数据相比 AmyP 分别提高了 3.1、2.8 和 1.3 倍。【结论】融合蛋白 AmyP-Clo 能高效降解生大米淀粉, 是一个具有优良应用价值的酶。

关键词: α -淀粉酶, 大米生淀粉, 融合表达, 淀粉结合结构域

大米是世界约 50%人口的主粮, 其重要性不言而喻。但是大米淀粉的深加工应用却远没有小麦、玉米等淀粉广泛^[1]。一个重要原因是大米生淀粉的成分和结构远比小麦、玉米等淀粉复杂^[2]。近几年, 随着无需糊化(高温破坏生淀粉结构的耗能过程)就能直接降解生淀粉的酶的深入研究, 生淀粉降解酶在方便食品、医药慢消化淀粉、多孔淀粉缓释剂、新型脂肪替代品等方面显示了广阔的应用前景^[3-4]。但是大部分生淀粉降解酶无法降解大米生淀粉, 或是降解能力很差。 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)是三大类生淀粉降解酶之一。目前报道的 α -淀粉酶中只有十余个酶具有降解大米生淀粉的

能力^[5-7], 而这十余个酶中仅有 2 个酶降解大米生淀粉的能力比降解小麦淀粉强, 它们分别是来自蚯蚓(*Eisenia foetida*)的 Amy II^[5]和来自 *Laceyella sacchari* 的淀粉酶^[7]。其余的 α -淀粉酶降解小麦、玉米等生淀粉的能力都远比大米强。此外, 由于生淀粉具有致密的结晶结构, 绝大部分生淀粉降解酶的降解速度都很慢, 常常需要 24 h 以上。已知的 α -淀粉酶中仅有 2 个能快速降解生淀粉。1 个来自 *Anoxybacillus flavothermus*, 降解 5%的玉米生淀粉仅需 2-3 h^[8]; 另 1 个来自 *Bacillus licheniformis*, 降解 1%的玉米生淀粉只需 3 h^[9]。缓慢的降解速度极大影响了酶的应用。

基金项目: 国家自然科学基金(31470207); 安徽省杰出青年科学基金(170808J04)

*通信作者。Tel: +86-510-63861928; E-mail: pph0259@126.com

收稿日期: 2017-03-31; 修回日期: 2017-06-02; 网络出版日期: 2017-06-09

α -淀粉酶 AmyP 是前期工作中从海洋宏基因组文库中获得的一个新型淀粉酶^[10]。它不仅对大米生淀粉具有绝对的偏好降解特性(比活是其他淀粉的 4 倍以上),而且对各种生淀粉的降解速度都很快,尤其是大米生淀粉,整个降解时间不超过 4 h,起始 30 min 内效率极高。这种“快速偏好降解大米生淀粉”的特性从未在其他已知的生淀粉降解酶中发现过^[6]。随后,我们发现 AmyP 虽然拥有一个淀粉结合结构域(SBD),但是该 SBD 对 AmyP 降解生淀粉的贡献较小^[11]。本文报道通过替换 SBD,将来源 *Clostridium butyricum* 的 SBD_{Clo}^[12]与 AmyP _{Δ SBD}融合,得到了一个具有更高的降解大米生淀粉能力的融合酶 AmyP-Clo。

1 材料和方法

1.1 克隆、表达和纯化融合蛋白 AmyP-Clo

来源 *C. butyricum* 的 SBD_{Clo}基因由上海生工合成,在 N 和 C 端分别引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I。含有缺失 SBD 的 AmyP _{Δ SBD}重组表达载体 pET28a-AmyP _{Δ SBD}由本实验构建^[11]。使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切 SBD_{Clo}和 pET28a-AmyP _{Δ SBD},然后采用标准的分子克隆技术将片段连接,在表达载体 pET28a 上形成融合基因 AmyP-Clo。质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)后,16 °C 诱导表达, AmyP-Clo 蛋白通过 Ni²⁺亲和和层析一步纯化。野生型 AmyP 的重组表达载体 pET28a-AmyP 由本实验室构建^[10],同样的方法得到纯化的 AmyP。

1.2 生淀粉酶活测定和蛋白浓度

采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定生淀粉降解后释放出的还原糖的量^[13],以葡萄糖为标准。一个标准反应体系包含 50 μ L 适当稀释的纯酶和 550 μ L 10% (W/V)大米或玉米生淀粉。酶和淀粉均

配置在 50 mmol/L 磷酸钠钾缓冲液(pH 7.5)中,在 40 °C 反应 10 min,立刻放置于冰冷的 0.3 mol/L Na₂CO₃ 溶液中,骤冷终止反应^[14],随后 4 °C 8000 \times g 离心 5 min,取上清测定还原糖的量。生淀粉使用前用 MilliQ 水洗涤 5 次,除去可能的还原糖。猪胰淀粉酶(pig pancreas, PPA, 购自 Sigma)的最适反应条件是 pH 7.0 (50 mmol/L 磷酸钠钾缓冲液)和 37 °C。一个标准酶活单位(U)定义为每分钟释放出 1 μ mol 还原糖所需的酶量。蛋白浓度采用 Bradford 法测定,牛血清白蛋白作为标准。

1.3 温度和 pH 对活性的影响

在 40 °C 测定不同 pH 值对大米生淀粉降解活性的影响。缓冲液为 50 mmol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 4.0 到 6.0)、磷酸钠钾缓冲液(pH 6.0 到 8.5)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 8.5 到 10.0),间隔区间为 0.5 个 pH。在最适 pH 7.5 下测定温度对降解活性的影响,温度范围为 10 °C 到 65 °C,间隔区间为 5 °C。

1.4 大米和玉米生淀粉的酶解动力学

采用 5%的大米或玉米生淀粉为底物,分别加入 60 U 的 AmyP-Clo、AmyP 和 PPA,在这 3 个酶各自的最适 pH 和温度条件下进行酶解。加入 0.2%的甲苯到反应混合液中防止可能的微生物污染^[15],终反应体系为 6 mL。反应混合液置于 37 °C 或 40 °C 的水浴锅中温和摇晃(100 r/min)反应 4 h,期间间隔不同的时间取样,每次取样 0.6 mL。取出的样品 4 °C 8000 \times g 离心 5 min,取上清测定还原糖的量。

1.5 生淀粉吸附能力测定

往 1 mL 的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中分别加入 0–90 mg 的大米生淀粉和玉米生淀粉,振荡后形成悬浊液,然后分别加入 1.8 μ mol/L 的

AmyP-Clo 和 AmyP。为了避免酶解反应对吸附的干扰, 将试管放置在冰水混合的水浴锅中温和摇晃(100 r/min)孵育 1 h。然后 4 °C 12000×g 离心 10 min, 取 100 μL 上清用 Bradford 法测定蛋白含量, 然后绘制吸附曲线。空白对照组用等体积缓冲液替代 SBD 蛋白。吸附率(%)=(总蛋白-上清中残留的蛋白)/总蛋白×100%。

2 结果和分析

2.1 融合蛋白 AmyP-Clo 构建、表达与纯化

委托上海生工直接合成 SBD_{Clo} 的基因 861 个碱基, 然后运用常规的分子克隆技术, 与 AmyP_{ΔSBD} 的基因连接, 成功构建了融合基因的重组表达质粒 pET28a-AmyP-Clo。质粒转化大肠杆菌后, 低温 16 °C 诱导后实现可溶性表达, 无包涵体。重组表达的 AmyP-Clo 蛋白已经融合了载体上的 His-tag 标签, 直接采用 Ni²⁺亲和和层析获得纯品(图 1)。实验室前期构建的 pET28a-AmyP 质粒也同样表达纯化, 获得野生型 AmyP 的纯酶。AmyP-Clo 蛋白有 779 个氨基酸, 理论分子量为 85.7 kDa, 从图 1 中可见重组表达的 AmyP-Clo 分子量与理论分子量吻合。野生型 AmyP 的分子量为 70.3 kDa。

2.2 pH 和温度对融合蛋白 AmyP-Clo 降解活性的影响

以大米生淀粉为底物, AmyP-Clo 的最适 pH 为 7.0(图 2-A), 与野生型 AmyP 相比, 降低了 0.5。虽然最适 pH 发生了变化, 但是酶活随 pH 变化的曲线整体上和野生型 AmyP 的曲线类似, 差别较小。AmyP-Clo 的最适温度没有改变, 依然与野生型 AmyP 的一样, 都为 40 °C(图 2-B)。AmyP-Clo

的酶活随温度变化的曲线整体上和野生型 AmyP 的曲线也类似, 但是各温度下的酶活都比野生型 AmyP 更高一点。例如, 30 °C 和 50 °C 时 AmyP-Clo 的酶活为最高酶活的 80%和 75%; 而同样温度时 AmyP 的酶活仅为最高酶活的 53%和 37%。这表明 AmyP-Clo 的温度适应性更好了, 可以在更为宽泛的温度下降解生淀粉。

2.3 AmyP-Clo 降解大米生淀粉和玉米生淀粉

在最适条件下, AmyP-Clo 降解大米生淀粉和玉米生淀粉的比活分别为(373.9±8.4) U/mg 和 (150.2±4.4) U/mg。野生型 AmyP 在最适条件下对大米生淀粉和玉米生淀粉的比活分别为(118.5±0.6) U/mg^[6]和(39.6±1.4) U/mg^[16]。因此, 融合蛋白 AmyP-Clo 的比活力分别提高了 3.1 和 3.8 倍。

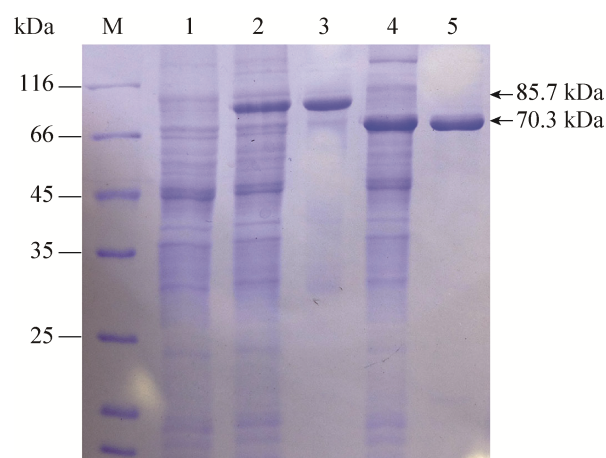


图 1. SDS-PAGE 分析融合蛋白 AmyP-Clo 和野生型 AmyP 的表达与纯化

Figure 1. SDS-PAGE analysis of the chimeric AmyP-Clo and wild-type AmyP expression and purification. M: size marker proteins; lane 1: the cell lysates of *E. coli* harboring pET28a; lane 2: the cell lysates of *E. coli* harboring pET28a-AmyP-Clo; lane 3: the purified AmyP-Clo protein; lane 4: the cell lysates of *E. coli* harboring pET28a-AmyP; lane 5: the purified AmyP protein.

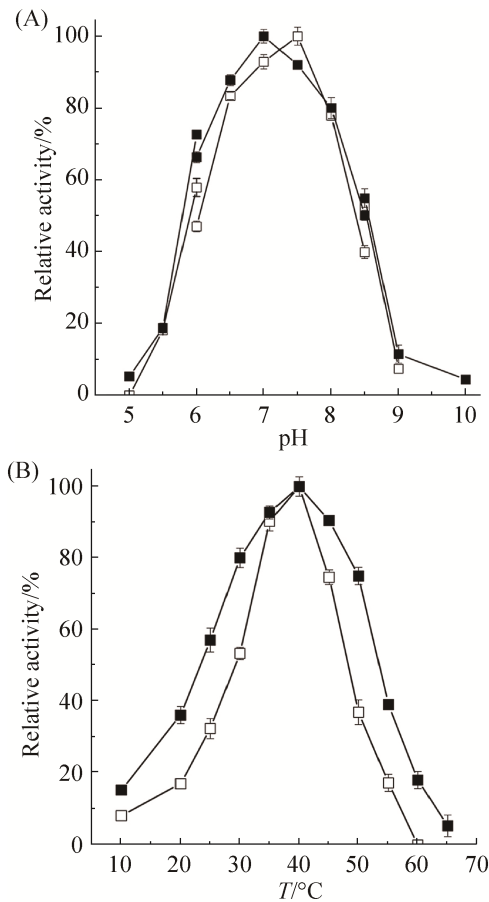


图 2. pH (A)和温度(B)对 AmyP-Clo(■)和 AmyP(□)生淀粉降解酶活的影响

Figure 2. Effects of pH (A) and temperature (B) on the activity of AmyP-Clo (■) and AmyP (□) towards raw starch. Values are the means \pm SD of three experiments ($n=3$).

为了进一步衡量比较 AmyP-Clo 的降解能力, 将 AmyP-Clo、AmyP 和 PPA 在酶量相同的条件下加到 5% 的大米生淀粉的悬浊液中, 测定其在 4 h 内的酶解动力学如图 3-A 所示。AmyP-Clo 的酶解动力学曲线和 AmyP 类似, 依然是典型的两阶段式, 即先为快速降解阶段, 然后是缓慢降解阶段。作为对照的典型生淀粉酶 PPA 则是持续增长模式。与 AmyP 相比, AmyP-Clo 对大米生淀粉的降解能力提高 2.8 倍, 4 h 的最终降解率达到

(42.7 \pm 1.1)%, 而 AmyP 的降解率为(15.5 \pm 0.5)%。相同时间内的 PPA 的降解率仅为(11.1 \pm 0.3)%。

这 3 个酶对 5% 的玉米生淀粉的酶解动力学如图 3-B 所示。与 AmyP 相比, AmyP-Clo 对玉米生淀粉的降解能力提高 3.3 倍, 4 h 的最终降解率达到(16.2 \pm 0.4)%, 而 AmyP 的降解率为(4.9 \pm 0.2)%。在多种生淀粉中, PPA 对玉米生淀粉的降解能力最强^[17]。4 h 时 PPA 的降解率为(17.2 \pm 0.6)%, 略高于 AmyP-Clo。

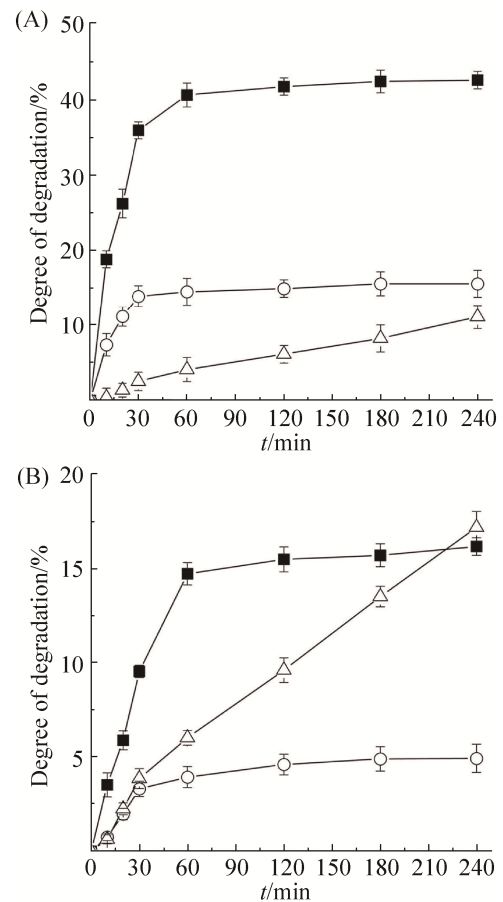


图 3. 融合蛋白 AmyP-Clo(■)、AmyP(○)和 PPA(Δ)对大米(A)和玉米生淀粉(B)的降解

Figure 3. Ability of the chimeric AmyP-Clo (■), AmyP (○) and PPA (Δ) to digest raw rice (A) and corn (B) starches. Values are the means \pm SD of three experiments ($n=3$).

2.4 AmyP-Clo 对大米生淀粉和玉米生淀粉的吸附能力

SBD 的主要功能是吸附生淀粉颗粒, 进而帮助酶在淀粉颗粒表面聚集, 提高酶降解生淀粉颗粒的能力。AmyP-Clo 对大米和玉米生淀粉的降解能力都比野生型 AmyP 显著提高, 那么 SBD_{Clo} 对生淀粉的结合能力极可能比 SBD_{AmyP} 强。为了验证融合蛋白 AmyP-Clo 降解生淀粉能力的提高确实是由于 SBD 结合能力的提高所致, 在蛋白的摩尔质量相同的条件下, 我们测定了 AmyP-Clo 和 AmyP 对大米(图 4-A)和玉米生淀粉(图 4-B)的结合

能力。结果表明, 融合蛋白 AmyP-Clo 对这两种生淀粉的结合能力确实都明显高于野生型 AmyP 的结合能力。对大米生淀粉而言, AmyP-Clo 的最高结合率为(71.1±1.6)%, AmyP 的最高结合率为(54±1.4)%; 对玉米生淀粉而言, AmyP-Clo 的最高结合率为(86.6±2.5)%, AmyP 的最高结合率为(32.5±1.1)%。这说明, 融合蛋白 AmyP-Clo 有了对生淀粉结合能力更强的 SBD_{Clo} 的帮助, 能更有效地结合生淀粉, 进而展示出比野生型 AmyP 更强的生淀粉降解能力。

3 讨论

不同植物来源的生淀粉具有不同的颗粒大小、表面微结构和内部结晶模式, 因此酶对不同来源的生淀粉的降解能力相差很大。 α -淀粉酶 AmyP 在降解大米生淀粉方面具有几个显著优势: 比活高、反应速度快、最适反应温度(40 °C)远低于淀粉的糊化温度、不需要添加 Ca²⁺。因此 AmyP 是一个具有应用价值的生淀粉降解酶。我们注意到将 AmyP 自身的 SBD 去除后, 虽然 AmyP _{Δ SBD} 对大米生淀粉的降解能力有所下降, 但是下降幅度不算很大^[11]。因此, 理论上可以采用替换 SBD 的办法进一步提高其降解能力。能降解大米生淀粉的 α -淀粉酶不多, 综合考虑酶的最适作用温度和 pH 等因素之后, 选择来源 *C. butyricum* T-7 的淀粉酶的 SBD_{Clo} 作为对象^[12]。这个酶降解生淀粉的能力依次是玉米>小麦>大米>土豆。

与预计结果类似, 融合蛋白 AmyP-Clo 对大米和玉米生淀粉的降解能力都得到了显著提高, 分别为野生型 AmyP 的 3.1 和 3.8 倍。单就提高倍数而言, 对玉米生淀粉的比活增加得更多, 这应

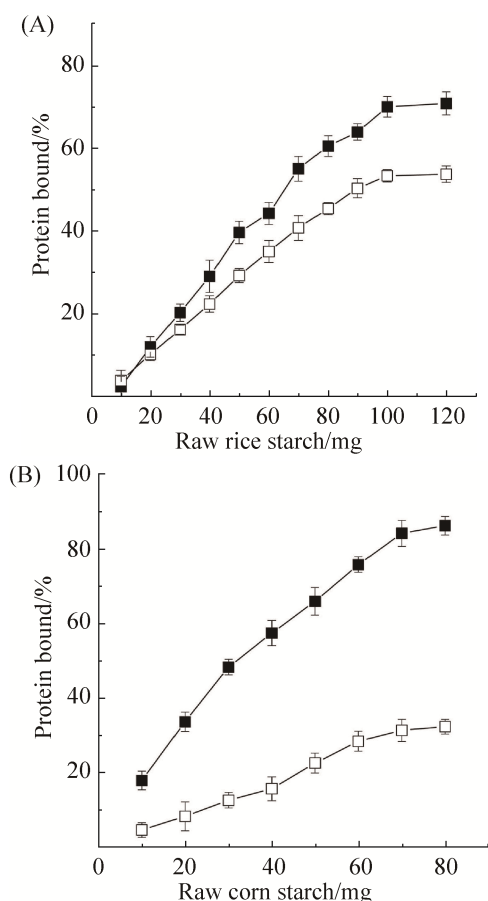


图 4. 融合蛋白 AmyP-Clo(■)和 AmyP(□)对大米(A)和玉米生淀粉(B)的结合能力

Figure 4. Ability of the chimeric AmyP-Clo (■) and AmyP (□) to bind raw rice (A) and corn (B) starches. Values are the means±SD of three experiments ($n=3$).

这是由于来源 *C. butyricum* T-7 的淀粉酶的最适作用底物是玉米。SBD 在生淀粉降解过程中的功能是“捕获”底物。因此，催化结构域对最终的降解率、酶的作用方式的贡献更大。从图 3 中可见，融合蛋白 AmyP-Clo 对大米和玉米生淀粉的酶解动力学过程与野生型 AmyP 的高度相似，保持了典型的两阶段式。只是由于 AmyP-Clo 的比活提高，整个降解率均提高。对优势底物大米生淀粉 (5%)，AmyP-Clo 在 4 h 的最终降解率达到 (42.7±1.1)%，是 AmyP 的 2.8 倍，是商品化的 PPA 的 3.8 倍。这表明 AmyP-Clo 是一个具有优良应用价值的酶。另外，AmyP-Clo 对玉米生淀粉的降解率虽然也显著提高为 AmyP 的 3.3 倍，但是 AmyP 本身对玉米生淀粉的降解能力不强，AmyP-Clo 在 4 h 的最终降解率略低于 PPA。通过融合 SBD 提高酶的活力在多个酶中获得过成功。例如：大麦 α -淀粉酶融合来源 *Aspergillus niger* 的葡糖糖化酶的 SBD^[18]，*Bacillus acidicola* 的 α -淀粉酶融合来源 *Geobacillus thermoleovorans* 的 α -淀粉酶的 SBD^[19]，它们的酶活都显著增加。

为了验证底物结合能力与降解能力之间的关系，我们测定了融合蛋白 AmyP-Clo 和野生型 AmyP 对生大米和玉米的结合能力。AmyP-Clo 确实对这两种生淀粉的结合能力都明显强于 AmyP，对生大米的最高结合率是 AmyP 的 1.3 倍，对生玉米的最高结合率是 AmyP 的 2.7 倍。比较出人意外的是 AmyP-Clo 对生大米的最高结合率提高的倍数只有 1.3 倍，但是比活增加了 3.1 倍，最终降解率增加了 2.8 倍。这也暗示了如果能寻找到与生大米淀粉结合能力更佳的 SBD，就有进一步提高酶活的可能性。

参 考 文 献

- [1] Bemiller JN. Starch modification: challenges and prospects. *Starch/Stärke*, 1997, 49(4): 127–131.
- [2] Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1998, 23(2): 85–112.
- [3] Sun HY, Zhao PJ, Ge XY, Xia YJ, Hao ZK, Liu JW, Peng M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(4): 988–1003.
- [4] Robertson GH, Wong DWS, Lee CC, Wagschal K, Smith MR, Orts WJ. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(2): 353–365.
- [5] Ueda M, Asano T, Nakazawa M, Miyatake K, Inouye K. Purification and characterization of novel raw-starch-digesting and cold-adapted α -amylases from *Eisenia foetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 150(1): 125–130.
- [6] Lei Y, Peng H, Wang Y, Liu YT, Han F, Xiao YZ, Gao Y. Preferential and rapid degradation of raw rice starch by an α -amylase of glycoside hydrolase subfamily GH13_37. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1577–1584.
- [7] Lomthong T, Chotineeranat S, Kitpreechavanich V. Production and characterization of raw starch degrading enzyme from a newly isolated thermophilic filamentous bacterium, *Laceyella sacchari* LP175. *Starch/Stärke*, 2015, 67(3/4): 255–266.
- [8] Tawil G, Viksø-Nielsen A, Rolland-Sabaté A, Colonna P, Buléon A. Hydrolysis of concentrated raw starch: a new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 46–52.
- [9] Božić N, Ruiz J, López-Santín J, Vujčić Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 53(2): 203–209.
- [10] Liu Y, Lei Y, Zhang XC, Gao Y, Xiao YZ, Peng H. Identification and phylogenetic characterization of a new subfamily of α -amylase enzymes from marine microorganisms. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(3): 253–260.
- [11] Peng H, Zheng YY, Chen MJ, Wang Y, Xiao YZ, Gao Y. A starch-binding domain identified in α -amylase (AmyP) represents a new family of carbohydrate-binding modules that contribute to enzymatic hydrolysis of soluble starch. *FEBS Letters*, 2014, 588(7): 1161–1167.
- [12] Tanaka T, Ishimoto E, Shimomura Y, Taniguchi M, Oi S. Purification and some properties of raw starch-binding amylase of *Clostridium butyricum* T-7 isolated from

- mesophilic methane sludge. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(2): 399–405.
- [13] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [14] Tahir R, Ellis PR, Butterworth PJ. The relation of physical properties of native starch granules to the kinetics of amylolysis catalysed by porcine pancreatic α -amylase. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 81(1): 57–62.
- [15] Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Raw starch degradation by the non-raw starch-adsorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Carbohydrate Research*, 1998, 314(3/4): 251–257.
- [16] Peng H, Lei Y, Liu YT, Wang Y. Degradation of raw corn starch by an α -amylase (AmyP) from marine environment. *China Biotechnology*, 2012, 32(7): 79–83. (in Chinese)
彭惠, 雷寅, 刘源涛, 汪颖. 海洋环境来源的淀粉酶 AmyP 对生玉米淀粉的降解特性. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(7): 79–83.
- [17] Iefuji H, Chino M, Kato M, Iimura Y. Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochemical Journal*, 1996, 318(3): 989–996.
- [18] Juge N, Nøhr J, Le Gal-Coëffet MF, Kramhøft B, Furniss CSM, Planchot V, Archer DB, Williamson G, Svensson B. The activity of barley α -amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2006, 1764(2): 275–284.
- [19] Parashar D, Satyanarayana T. A chimeric α -amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(4): 473–484.

Hydrolysis of raw rice starch by a chimeric α -amylase engineered with α -amylase from *Clostridium butyricum* T-7

Jing Wang, Lu Zhai, Xiaohan Zhang, Fengling Li, Yazhong Xiao, Hui Peng*

Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] To obtain efficient raw rice starch-digesting enzymes. [Methods] α -Amylase AmyP can hydrolyze raw rice starch efficiently. We constructed a chimeric α -amylase (AmyP-Clo) by fusion of the catalytic domain of AmyP and a starch binding domain of α -amylase from *Clostridium butyricum* T-7. [Results] AmyP-Clo retained the advantages of AmyP, and increased catalytic efficiency towards raw rice starch. The specific activity was (373.9±8.4) U/mg. The final hydrolysis degree was (42.7±1.1)% for the hydrolysis of 5% raw rice starch suspension after 4 h. The maximal fraction of bound protein was (71.1±1.6)%. [Conclusion] AmyP-Clo could efficiently hydrolyze raw rice starch.

Keywords: α -amylase, raw rice starch, chimeric protein, starch binding domain

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31470207) and by the Science Fund for Distinguished Young Scholars of Anhui Province, China (170808J04)

*Corresponding author. Tel: +86-510-63861928; E-mail: pph0259@126.com

Received: 31 March 2017; Revised: 2 June 2017; Published online: 9 June 2017