

响应面法优化高山被孢霉产花生四烯酸的合成培养基研究

潘森, 孙立洁*, 陈祥松, 袁丽霞, 吴金勇, 凌瑞, 姚建铭*

(中国科学院合肥物质科学研究院等离子体物理研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的]对高山被孢霉利用合成培养基液体发酵产花生四烯酸(ARA)的发酵液组分进行优化。[方法]对培养基中的碳源进行了优化,对单一碳源、复合碳源进行筛选,并优化了它们的起始浓度。利用单因素试验对多种无机氮源进行了筛选。对具有显著效应的葡萄糖、甘油、酵母粉和氨基酸混合物4个因素进行最陡爬坡试验后,利用响应面中心组合设计对显著因素进行了优化。[结果]最佳碳源组合为葡萄糖80 g/L+甘油20 g/L。以酵母粉为氮源,以氨基酸混合物为生长因子添加到培养基中,可促进高山被孢霉发酵液中ARA的积累。最佳合成培养基组分为:葡萄糖80 g/L,甘油12 g/L,酵母粉20 g/L,氨基酸混合物0.3 g/L。对优化后的合成培养基进行了验证,摇瓶发酵培养7 d后检测其产量,测得平均产量为7.084 1 g/L,与预测值接近。[结论]该研究结果可为进一步提高ARA在工业化生产中的得率提供研究基础。

关键词 花生四烯酸;高山被孢霉;合成培养基;响应面法

中图分类号 TQ921 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)09-0001-04

Study on the Optimization of Synthetic Culture Medium for Producing Arachidonic Acid with *Mortierella alpina* by Using Response Surface Methodology

PAN Miao, SUN Li-jie*, CHEN Xiang-song, YAO Jian-ming* et al (Institute of Plasma Physics, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To study and optimize the ingredients of fermented liquid for synthetic culture medium for producing arachidonic acid with *Mortierella alpina* and increase the yield of ARA. [Method] The carbon sources in the culture medium were optimized, single carbon source and composite carbon source were screened and their initial concentrations were optimized. Many kinds of inorganic nitrogen sources were screened out by using single factor test. After steepest ascent test on four significant factors (glucose, glycerol, yeast powder and amino acid mixture) with significant effects, significant factors were optimized by using response surface center combination design. [Result] The optimum carbon source combination was 80 g/L glucose + 20 g/L glycerol. Taking yeast powder as nitrogen source, amino acid mixture added in the culture medium as a growth factor could promote the accumulation of ARA in the fermentation liquid of *M. alpina*. The optimized synthetic medium was composed of 80 g/L glucose, 12 g/L glycerol, 20 g/L yeast powder and 0.3 g/L amino acid mixture. The optimized synthetic medium was verified and the yield was detected after shake flask fermentation culture 7 days. The average yield of ARA was 7.084 1 g/L, which was close to the predicted value. [Conclusion] The research results can provide research basis for improving the yield of ARA in the industrial production of ARA further.

Key words Arachidonic acid; *Mortierella alpina*; Synthetic culture medium; Response surface methodology

花生四烯酸(Arachidonic acid,简称ARA或AA),系统命名为全顺 Δ -5,8,11,14-二十碳四烯酸,属于 ω -6系列的多不饱和脂肪酸。它是人体前列腺素合成的重要前体物质,具有酯化胆固醇、抑制血小板聚集、增加血管弹性、降低血液黏度、调节白细胞功能和提高免疫力等一系列生理功能,已经在保健食品、医药、化妆品等领域得到广泛应用^[1-2]。天然来源中ARA含量低,不适宜大规模提取。近年来,利用高山被孢霉发酵法生产ARA因其产品中ARA含量高、且油脂组成合理等特点,一直作为工业生产的主要方式^[3]。

在微生物发酵过程中,微生物的生长和代谢主要依靠碳源、氮源及生长因子,微生物一般可利用多种碳源和氮源,但其利用率差异较大^[4]。高山被孢霉生物量的积累需消耗大量的碳源和氮源^[5-6],而油脂的积累主要依赖于消耗碳源^[7]。氮源在微生物的生长及发酵过程中发挥着重要作用,通常分为快速氮源和迟效氮源^[8]。研究发现,氮源在高山被孢霉发酵路径中,参与多种酶的调控过程,如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、ATP柠檬酸裂解酶、脂肪酸合成酶、6-磷酸葡萄糖

糖酸脱氢酶^[9]等,当氮源耗尽而碳源仍然存在时,高山被孢霉的生长受到限制^[10],此时脂肪开始积累作为储存能量^[11];另外,不同氮源对发酵培养基pH的影响较大,同样会影响到油脂的积累及ARA合成^[12]。笔者采用响应面法对高山被孢霉产花生四烯酸的合成培养基进行了优化,旨在为提高ARA工业化生产水平提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。高山被孢霉高产菌G10,由中国科学院生物技术工程平台分离获得;菌种保存于甘油管中,置于-80℃冰箱内,每6个月转存1次。

1.1.2 原培养基(CK)。种子培养基及发酵培养基均为葡萄糖80 g/L,酵母粉20 g/L,pH自然。

1.2 方法

1.2.1 发酵培养。将斜面上的孢子刮下,制备孢子悬液,取5 mL孢子悬液接种于装有100 mL种子培养基的三角瓶中,于28℃、湿度40%~60%、摇床转速220 r/min条件下培养2 d,将生长好的种子以10%的接种量接入500 mL装有100 mL发酵培养基的三角瓶中,与种瓶培养条件相同,发酵7~11 d。

1.2.2 测定项目与方法。

1.2.2.1 发酵菌体生物量。摇瓶发酵结束后,使用布氏漏斗对发酵液进行抽虑;抽干得到的菌体放入烘箱105℃烘

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(2014AA021703);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2013]693号)。

作者简介 潘森(1992—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向:微生物育种及发酵工艺。*通讯作者:孙立洁,副研究员,博士,从事生物合成营养化学品研发;姚建铭,研究员,博士,博士生导师,从事微生物育种及发酵工艺研究。

收稿日期 2016-12-24

干,计算干重 W 即为生物量。

1.2.2.2 菌体油脂产量。①使用研钵将烘干的菌体进行研磨至细小的粉末,称取上述研磨的粉末 1~2 g,取精确值 W_0 ,用滤纸包住并系上棉绳,放入烘箱 105 °C 烘至恒重,称得滤纸包重量 W_1 。②将上述的滤纸包放入索氏提取器内,用石油醚进行索氏提取 8~10 h 后取出,105 °C 烘干,称纸包重量 W_2 。按照以下公式计算菌体油脂百分含量:菌体油脂百分含量(%) = $(W_1 - W_2) / W_0 \times 100\%$ 。③按照以下公式计算油脂产量:油脂产量(g/L) = 生物量(g/L) × 油脂百分含量(%)。

1.2.2.3 油脂中 ARA 产量。①样品处理(甲酯化)。称取研磨菌渣约 0.1 g,加入 1 mL 0.5% 氢氧化钾甲醇溶液,于 60 °C 条件下水浴 30 min,每 5 min 摇匀 1 次,然后加入 1 mL 三氟化硼甲醇溶液,置于 60 °C 条件下水浴 30 min,每 5 min 摇匀 1 次,此后加入 2 mL 正己烷混匀后再加入 1 mL 饱和氯化钠溶液摇匀,反应完毕后将反应液以 4 000 r/min 的转速离心 5 min,取上层液体进行气相检测。②气相色谱检测条件。DB-23ms(30.0 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 石英毛细管色谱柱。柱温程序如下:90 °C 保持 1 min,此后以 9 °C/min 升至 240 °C,保持 5 min;载气为氮气;流速为 2.0 mL/min;进样口温度为 250 °C;进样模式为分流进样(分流比 1:10);进样量为 1 μL;检测器温度为 280 °C。③ARA 百分含量的计算。ARA 百分含量的计算采用面积归一法,即 ARA 在气相检测图谱中的峰面积占总峰面积的百分比,用以评估 ARA 在总油脂含量中所占百分含量。④ARA 产量的计算。按照以下公式计算 ARA 产量:ARA 产量(g/L) = 生物量(g/L) × 油脂百分含量(%) × ARA 百分含量(%)。

2 结果与分析

2.1 碳源优化试验

2.1.1 单一碳源对高山被孢霉生长及发酵的影响。选择甘油、蔗糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖为单一碳源,浓度为 80 g/L,培养基其余成分及含量不变。发酵培养 7 d 后检测其生物量、油脂产量和 ARA 产量,结果表明在所有培养基的条件下高山被孢霉均可正常生长,但添加不同种碳源其 ARA 产量不同,结果如图 1 所示。在试验所用的 5 种碳源中,葡萄糖作为碳源进行发酵所得 ARA 产量最高,为 6.12 g/L,其次是乳糖作为碳源发酵所得 ARA 产量(5.65 g/L),而蔗糖作为唯一碳源发酵所得 ARA 产量最低,仅为 5.19 g/L。

2.1.2 复合碳源对高山被孢霉生长及发酵的影响。试验结果表明,葡萄糖为最佳单一碳源,而麦芽糖、蔗糖、甘油作为单一碳源时 ARA 也可积累,但产量较低。以葡萄糖为主要碳源,在此基础上分别添加其他 3 种碳源作为复合碳源,发酵培养基中氮源成分均为酵母粉 20 g/L,碳源成分为:A. 60 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 麦芽糖;B. 80 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 麦芽糖;C. 60 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 蔗糖;D. 80 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 蔗糖;E. 60 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 甘油;F. 80 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 甘油。发酵培养 7 d 后检测其生物量、油脂产量和 ARA 产量。从图 2 可以看出,利用 60 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 蔗

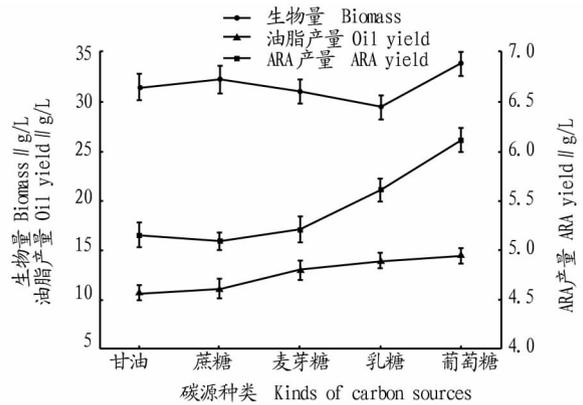


图 1 单一碳源对高山被孢霉生长及发酵的影响

Fig. 1 Effects of single carbon sources on the growth and fermentation of *M. alpina*

糖为复合碳源进行发酵时,ARA 产量最低(5.13 g/L)。80 g/L 葡萄糖 + 20 g/L 甘油为高山被孢霉提供碳源,最有利于其生长及 ARA 积累,ARA 产量达 6.21 g/L。

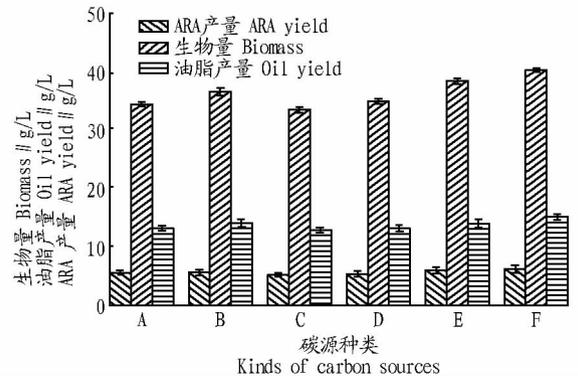


图 2 复合碳源对高山被孢霉生长及发酵的影响

Fig. 2 The effects of composite carbon sources on the growth and fermentation of *M. alpina*

2.2 氮源优化 在高山被孢霉的发酵培养基中,普遍使用酵母粉作为氮源,但因其成分复杂,且稳定性差,不同生产批次也会略有不同,导致产量波动,并会对基础理论的研究产生一定的影响,因此选择合适的无机氮源至关重要。氮源主要包括 NH_4OH 、硫酸氨(生理酸性物质)、硝酸钾(生理碱性物质)、维生素、核苷混合物和氨基酸混合物。其中,核苷酸和氨基酸混合物的浓度主要参考文献[13]并做适当调整,具体试验组成分如下:A. 酵母粉 20.0 g/L;B. 氨基酸混合物(蛋氨酸 184 mg/L、胱氨酸 184 mg/L、丝氨酸 92 mg/L、苏氨酸 92 mg/L);C. 硝酸钾 5.0 g/L;D. NH_4OH 2.5 g/L;E. 硫酸氨 3.0 g/L;F. 维生素混合物(VB₆ 2 mg/L、烟酸 2 mg/L、泛酸钙 2 mg/L、生物素 2 mg/L、叶酸 2 mg/L)。

利用上述各组分制备的发酵液培养高山被孢霉 7 d 后进行检测。从图 3 可以看出,以无机氮源硝酸钾、 NH_4OH 等替代有机氮源酵母粉会明显影响 ARA 产量,约为正常发酵(A 组)ARA 产量的 30%。但是,以氨基酸混合物为氮源时,ARA 产量达 2.82 g/L,略高于其他无机氮源组,推测这是由于氨基酸混合物除了能为高山被孢霉发酵提供氮源外,还

可作为生长因子参与到高山被孢霉生长及代谢过程中,因此推测在酵母粉提供氮源的基础上,氨基酸混合物作为生长因子,可促进高山被孢霉发酵中 ARA 的积累。

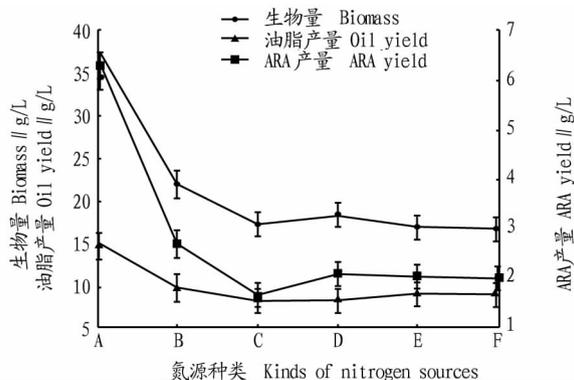


图3 不同氮源对高山被孢霉生长及发酵的影响

Fig.3 The effects of different nitrogen sources on the growth and fermentation of *M. alpina*

2.3 响应面法分析多因素发酵液组分对高山被孢霉生长和ARA积累的影响 响应面法(Response surface methodology)是利用合理的试验设计方案,采用多元二次回归方程拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析优化工艺参数,预测响应值的一种统计方法^[14]。随着统计学在各个领域的发展和运用,响应面法已经被广泛应用于食品学、工程学、生态学等多个领域^[15]。

通过中心组合设计(Central composite design, CCD),取4因素5水平 $[\pm \alpha$ (轴向点)、 ± 1 (因素点)和中心点],对 α 值进行设定,试验取 $\alpha = 2$ 采用中心组合设计对最陡爬坡试验确定的中心区域进行考察,使用 Minitab 17 软件对试验数据进行处理分析。对响应面优化结果确定的各显著影响因素的最佳取值及预测结果进行试验验证和可靠性分析,得到最终的优化结果。

2.3.1 中心试验点的确定。通过上述试验得到对高山被孢霉发酵产量具有显著影响的4个因素:葡萄糖(A)、甘油(B)、酵母粉(C)、氨基酸混合物(D),其中氨基酸混合物为蛋氨酸:胱氨酸:丝氨酸:苏氨酸=2:2:1:1。

针对这4种因素的浓度进行最陡爬坡试验,显著因素的变化方向、步长和试验结果见表1,将4种显著因素采用拟合的回归方程模型的系数符号及大小来确定显著因素的步长及变化方向,使响应值快速地逼近最大响应区间。由表1可知,利用发酵成分组合(葡萄糖80.0 g/L,甘油12.0 g/L,酵母粉

表1 最陡爬坡试验设计及结果

Table 1 The design and results of steepest ascent test g/L

序号 No.	因素 Factor				ARA 产量 ARA yield
	A	B	C	D	
1	32.0	24.0	8.0	0.6	4.21
2	48.0	20.0	12.0	0.5	4.36
3	64.0	16.0	16.0	0.4	6.80
4	80.0	12.0	20.0	0.3	7.02
5	96.0	8.0	24.0	0.2	6.51
6	112.0	4.0	28.0	0.1	6.68

20.0 g/L和氨基酸混合物0.3 g/L)进行发酵,ARA产量最高,因此以第4组的试验水平作为中心组合设计试验的中心点。

2.3.2 中心组合设计以及响应面分析。根据最陡爬坡试验确定的响应面优化的中心点,运用 Minitab 17 软件中的组合试验设计4因素5水平的响应面优化,具体设计方案及试验结果见表2和3。利用 Minitab 17 软件对试验结果进行多元回归分析,经过拟合得到二次回归方程模型。

表2 中心组合试验设计

Table 2 The design of CCD g/L

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
-2	48.0	4.0	12.0	0.1
-1	64.0	8.0	16.0	0.2
0	80.0	12.0	20.0	0.3
1	96.0	16.0	24.0	0.4
2	112.0	20.0	28.0	0.5

表3 中心组合试验结果

Table 3 The results of CCD g/L

序号 No.	因素 Factor				ARA 产量 ARA yield
	A	B	C	D	
1	-1	-1	-1	-1	5.751
2	1	-1	-1	-1	5.117
3	-1	1	-1	-1	4.822
4	1	1	-1	-1	4.013
5	-1	-1	1	-1	6.210
6	1	-1	1	-1	5.750
7	-1	1	1	-1	5.210
8	1	1	1	-1	5.760
9	-1	-1	-1	1	4.552
10	1	-1	-1	1	5.395
11	-1	1	-1	1	4.689
12	1	1	-1	1	5.416
13	-1	-1	1	1	4.756
14	1	-1	1	1	5.807
15	-1	1	1	1	5.197
16	1	1	1	1	5.954
17	-2	0	0	0	5.042
18	2	0	0	0	6.316
19	0	-2	0	0	5.954
20	0	2	0	0	5.013
21	0	0	-2	0	5.047
22	0	0	2	0	5.687
23	0	0	0	-2	5.033
24	0	0	0	2	4.415
25	0	0	0	0	7.042
26	0	0	0	0	7.250
27	0	0	0	0	6.935

$$\begin{aligned} \text{ARA 产量 (g/L)} = & 7.076 + 0.1910A - 0.1729B + \\ & 0.2566C - 0.0872D - 0.3557A^2 - \\ & 0.4045B^2 - 0.4337C^2 - 0.5944D^2 + \\ & 0.0259AB + 0.1113AC + 0.2950AD + \\ & 0.0927BC + 0.2350BD - 0.0972CD \end{aligned}$$

根据响应面分析三维图,可得出碳源葡萄糖(A)、甘油(B)、氮源酵母粉(C)和生长因子氨基酸混合物(D)4因素对ARA产量的影响,具体如图4所示。

通过回归方程得到以下优化结果:A=99.390 g/L、B=9.090 g/L、C=25.495 g/L、D=0.4596 g/L,预测最大响应值为7.1664 g/L。从图4可以看出,两两因素间的交互作用较

明显,最佳预测值在试验考察范围内,因此可采用此方法所

得的各因素最佳值进行试验发酵效果验证。

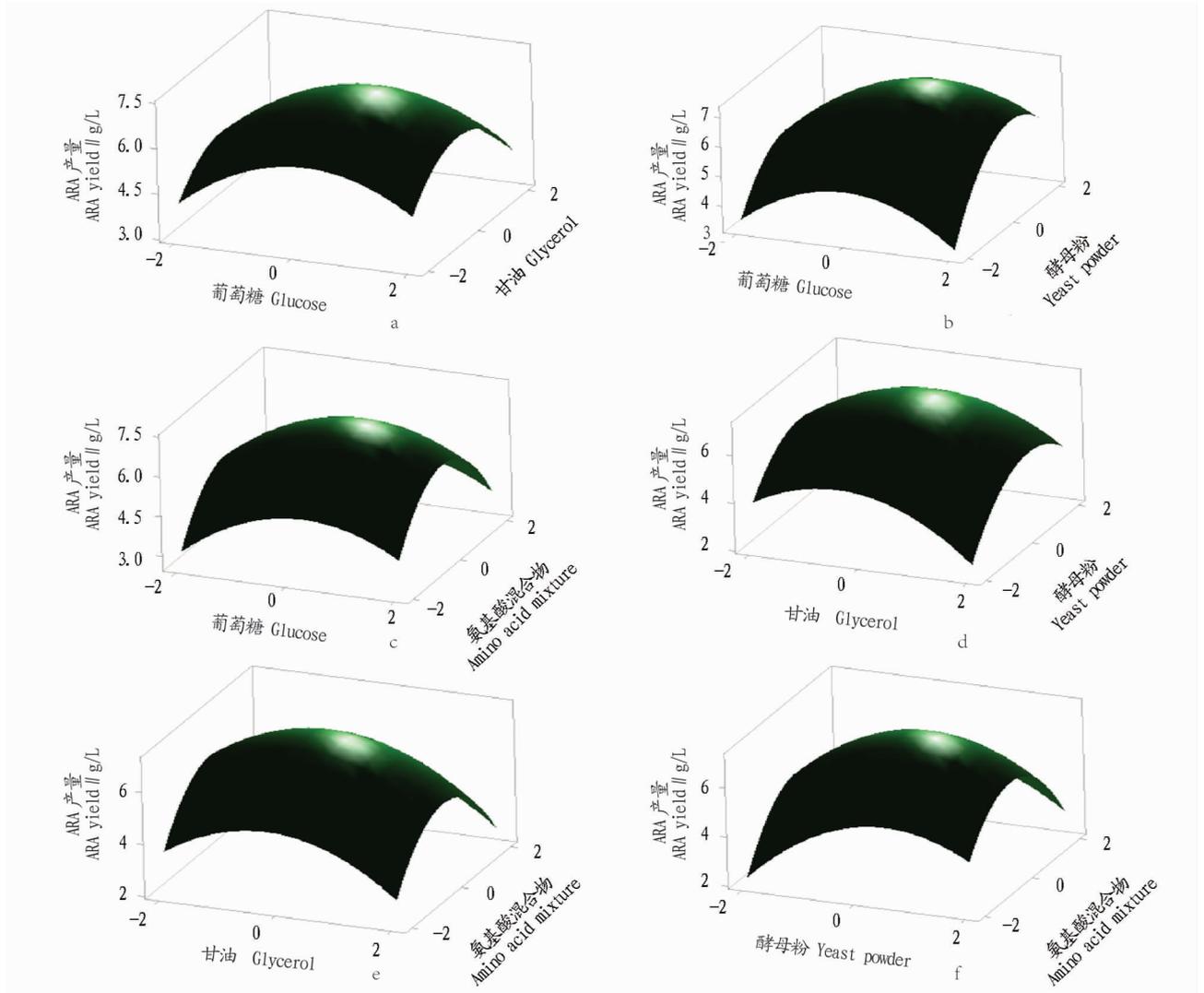


图4 4因素对ARA产量的影响响应面分析

Fig. 4 The analysis on the influences of four factors on the yield of ARA by response surface methodology

2.4 验证试验 根据最优化的4因素成分配制发酵培养基,进行3批次试验验证,每批次设5个平行瓶,摇瓶发酵培养7 d后检测ARA产量,结果表明平均ARA产量为7.084 1 g/L,与预测值(7.166 4 g/L)接近。摇瓶发酵培养11 d后检测ARA产量,平均ARA产量达8.031 4 g/L。

3 结论

笔者对高山被孢霉发酵培养基进行了优化,分别对碳源、有机氮源、无机氮源及多种生长因子的添加量进行了研究。在碳源优化研究中,考察多种单一碳源和复合碳源对高山被孢霉产ARA的影响,结果发现摇瓶发酵时葡萄糖是最佳的单一碳源,而80 g/L葡萄糖+20 g/L甘油混合则是最佳的复合碳源,使用复合碳源发酵测得ARA产量比使用单一葡萄糖碳源提高了18.6%。在用无机盐及多种生长因子代替酵母粉提供氮源的研究中发现,酵母粉作为迟效氮源,最有利于高山被孢霉的生长及油脂积累,并能获得较高的ARA产量。以无机盐及生长因子作为氮源,虽然目前尚不能满足工业发酵的需求,但其优势是成分简单及含量稳定,可

避免工业生产中因酵母粉生产批次不同而导致ARA产量的不稳定现象,该研究结果可为今后合成培养基代替传统培养基的研究奠定基础。笔者通过响应面分析法确定了发酵培养基中多因素间的交互作用,得出最优培养基组成,为高山被孢霉在工业生产中的发酵应用研究提供了理论依据。

参考文献

- [1] 姚昕,秦文,齐春梅,等.花生四烯酸的生理活性及其应用[J].粮油加工与食品机械,2004(5):57-59.
- [2] 袁成凌,姚建铭,余增亮.花生四烯酸及其代谢物的生物学作用[J].中国药物化学杂志,2000,10(1):75-78.
- [3] DAI M H, ZIESMAN S, RATCLIFFE T, et al. Visualization of protoplast fusion and quantitation of recombination in fused protoplasts of auxotrophic strains of *Escherichia coli* [J]. *Metabolic engineering*, 2005, 7(1): 45-52.
- [4] PARK E Y, KOIKE Y, CAI H J, et al. Morphological diversity of *Mortierella alpina*: Effect of consumed carbon to nitrogen ratio in flask culture [J]. *Biotechnology & bioprocess engineering*, 2001, 6(3): 161-166.
- [5] WYNN J P, HAMID A A, LI Y, et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina* [J]. *Microbiology*, 2001, 147 (Pt 10): 2857-2864.

(下转第16页)

知识。另一方面,当地政府应制定相关的法律政策保护和弘扬民族地区的传统知识,而不仅只是在民族地区进行传统植物知识的宣传。

参考文献

- [1] 梁永禧,吴志敏,李秉滔. 华南藤黄科植物分类的初步研究[J]. 华南农业大学学报,1996,17(3):52-58.
- [2] YAPWATTANAPHUN C, SUBHADRABANDHU S, SUGIURA A, et al. Utilization of some *Garcinia* species in thailand[J]. Acta horticulture, 2002, 575:563-570.
- [3] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志:第50卷·第2分册[M]. 北京:科学出版社,1990:1-112.
- [4] 郑小春,龚期绳,刘忠源. 多花山竹子的播种育苗[J]. 林业实用技术, 2003(7):26.
- [5] 张德明. 园林新秀岭南山竹子及其种子繁殖[J]. 植物杂志,1995(1):16.
- [6] CHACKO K C, PILLAI P K C. Seed characteristics and germination of *Garcinia gummigutta* (L.) Robs. [J]. Indian forester, 1997, 123(2):123-126.
- [7] 王鸣,冯煦,赵友谊,等. 中药藤黄的研究和应用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(1):1-4.
- [8] 陈文吟,余宙耀,李灼亮. 肝毒清方单味药水提物的体外抗 HBV 作用[J]. 中药材,1999,22(9):463-465.
- [9] 余宙耀,陈文吟,郑业华. 山竹子根乙醇提取物的体外抗 HBV 作用[J]. 中药材,1999,22(3):142-143.
- [10] 李宗友. 双黄酮的抗病毒作用[J]. 国外医学(中医中药分册),2000,22

(3):179-180.

- [11] 史玉俊. 云南山竹子中的抗疟吨吨酮[J]. 中草药,1999,30(6):5.
- [12] 廖红,杨永瑾,陈纤,等. 山竹子治疗烫伤的实验研究[J]. 实用中西医结合杂志,1996,9(3):156.
- [13] 林源,黄安林,廖红. 山竹子粉治疗烧伤 36 例临床观察[J]. 广西医科大学学报,1996,13(3):71-72.
- [14] 罗建设. 山竹子粉治疗烧伤及表浅创面 56 例报告[J]. 右江民族医学院学报,2003,25(6):845-846.
- [15] 廖红,杨永瑾,陈纤,等. 山竹子烧伤散抑菌作用分析[J]. 广西医科大学学报,1992,9(2):39-40.
- [16] 裴盛基. 民族植物学与植物资源开发[J]. 云南植物研究,1988(S1):135-144.
- [17] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005.
- [18] 吴征镒. 云南植物志[M]. 北京:科学出版社,2006.
- [19] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [20] 李景秀,管开云,孔繁才. 云南金丝桃属植物资源的调查研究[J]. 园艺学报,2003,30(2):171-174.
- [21] 李景秀,管开云,施宗明. 滇中奇葩——金丝桃[J]. 植物杂志,2000(3):1.
- [22] 关文灵,刘芳,郑思乡. 云南金丝桃属植物资源及其园林应用[J]. 中国野生植物资源,2002,21(1):22-23,40.
- [23] 裴盛基,淮虎银. 民族植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:161.

(上接第4页)

- [6] 肖尚,孙立洁,姚黎明,等. 补料分批发酵对隐甲藻生长和积累 DHA 的影响[J]. 食品与发酵工业,2013,39(9):31-35.
- [7] STREDANSKÁ S, ŠAJBIDOR J. Influence of carbon and nitrogen sources on the lipid accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina* [J]. Acta biotechnologica, 2004, 13(2):185-191.
- [8] 肖尚,孙立洁,袁丽霞,等. 复合碳源对隐甲藻积累 DHA 的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2013,41(6):110-114.
- [9] JANG H D, LIN Y Y, YANG S S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina* [J]. Biore-source technology, 2005, 96(15):1633-1644.
- [10] RATLEDGE C, WYNN J P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms[J]. Advances in applied

microbiology, 2002, 51:1-52.

- [11] 王鸿超. 产油真菌高山被孢霉的脂质合成机理研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [12] 王宇. pH 和氮源对高山被孢霉油脂积累的调控机理研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [13] 麻俊侠,樊明涛,王树林,等. β -胡萝卜素降解葡萄球菌化学成分培养基营养元素的研究[J]. 食品科学,2013,34(5):137-141.
- [14] DANH L T, MAMMUCARI R, TRUONG P, et al. Response surface method applied to supercritical carbon dioxide extraction of *Vetiveria zizanioides* essential oil[J]. Chemical engineering journal, 2009, 155(3):617-626.
- [15] 杨文雄,高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂,2005(2):68-71.

名词解释

扩展学科扩散指标:指在统计源期刊范围内,引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{引用刊数}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展学科扩散指标:指期刊所在学科内,引用该刊的期刊数占全部期刊数量的比例。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{所在学科内引用被评价期刊的数量}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展被引半衰期:指该期刊在统计当年被引用的全部次数中,较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标,通常不是针对个别文献或某一组文献,而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数:指该期刊在统计当年被引的论文中,至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。

平均引文数:指来源期刊每一篇论文平均引用的参考文献数。

平均作者数:指来源期刊每一篇论文平均拥有的作者数,是衡量该期刊科学生产能力的一个指标。

地区分布数:指来源期刊登载论文所涉及的地区数,按全国 31 个省市计(不包括港澳台)。这是衡量期刊论文覆盖面和全国影响力大小的一个指标。

机构分布数:指来源期刊论文的作者所涉及的机构数。这是衡量期刊科学生产能力的另一个指标。