



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819581.X

[43] 公开日 2005年9月28日

[11] 公开号 CN 1675352A

[22] 申请日 2003.8.19 [21] 申请号 03819581.X

[30] 优先权

[32] 2002.8.19 [33] KR [31] 10-2002-0048915

[32] 2002.8.19 [33] KR [31] 10-2002-0048916

[86] 国际申请 PCT/KR2003/001666 2003.8.19

[87] 国际公布 WO2004/016771 英 2004.2.26

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.18

[71] 申请人 可隆株式会社

地址 大韩民国京畿道

共同申请人 威科技术公司

[72] 发明人 韩熙龙 张圣弘 金乙济 朴重庆
韩永进 李 忠 朴兴顺 金润哲
朴镐珍

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 生产透明质酸的微生物及透明质酸的纯化方法

[57] 摘要

本发明涉及生产透明质酸的菌株链球菌 KL0188 和一种纯化透明质酸的方法，具体而言涉及不表达透明质酸酶的非溶血性的链球菌 KL0188 以及一种使用芳族吸附树脂和活性炭纯化透明质酸的方法。

1. 一种生产透明质酸的微生物菌株链球菌 KL0188(KCTC), 所述链球菌不表达透明质酸酶并表现出非溶血性能。

2. 一种纯化透明质酸的方法, 该方法包括如下步骤: 用芳族吸附树脂处理权利要求 1 的链球菌 KL0188 (KCTC 10248BP) 的培养液, 用活性炭处理上述培养液, 并用有机溶剂使其沉淀以纯化透明质酸及其盐。

3. 权利要求 2 的纯化透明质酸的方法, 其特征在于芳族吸附树脂选自 HP10、HP20、HP21、HP30、SP800、SP825、SP850、SP875、SP205、SP206 和 SP207。

4. 权利要求 2 的纯化透明质酸的方法, 其特征在于所述方法包括:

(a) 由生产透明质酸的微生物菌株的培养液制备培养滤液;

(b) 向培养滤液中加入芳族吸附树脂, 搅拌, 并进行超滤以制备已除去发热物质的透明质酸的水溶液;

(c) 向透明质酸的水溶液中加入有机溶剂以沉淀透明质酸及其盐, 并干燥沉淀,

其中所述方法还包括在步骤 (a) 或 (c) 后向培养滤液中或透明质酸的水溶液中加入活性炭以及除去活性炭。

5. 一种由权利要求 4 的方法纯化得到的透明质酸及其盐。

6. 一种纯化透明质酸的方法, 该方法包括如下步骤: 用芳族吸附树脂处理生产透明质酸的菌株的培养液, 用活性炭处理上述培养液, 并用有机溶剂使其沉淀以纯化透明质酸及其盐。

7. 权利要求 6 的纯化透明质酸及其盐的方法, 其特征在于芳族吸附树脂是苯乙烯和二乙烯苯的共聚物或溴化聚苯乙烯。

8. 权利要求 6 的纯化透明质酸及其盐的方法, 其特征在于芳族吸附树脂选自 HP10、HP20、HP21、HP30、SP800、SP850、SP875、SP205、SP206 和 SP207。

9. 权利要求 6 的纯化透明质酸及其盐的方法, 其特征在于所述方法包括如下步骤:

(a) 由生产透明质酸的微生物菌株的培养液制备培养滤液;

(b) 向培养滤液中加入芳族吸附树脂, 搅拌, 并进行超滤以制备已除去发热物质的透明质酸的水溶液;

(c) 向透明质酸的水溶液中加入有机溶剂以沉淀透明质酸及其盐，并干燥沉淀，

其中所述方法还包括在步骤(a)或(c)后向培养滤液中或透明质酸的水溶液中加入活性炭以及除去活性炭。

- 5 10. 权利要求6的纯化透明质酸及其盐的方法，其特征在于生产透明质酸的微生物菌株是链球菌菌株。

生产透明质酸的微生物及透明质酸的纯化方法

发明背景

5 a) 发明领域

本发明涉及生产透明质酸的微生物菌株以及一种纯化透明质酸的方法, 具体而言涉及链球菌 KL0188 以及一种使用芳族吸附树脂和活性炭纯化透明质酸的方法。

b) 相关技术描述

10 透明质酸是一种无色高粘性的多糖, 其分子量为 50,000 ~ 13,000,000Da, 重复单元为以 (1-3) 和 (1-4) 键交替键接的葡糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖。透明质酸具有润肤作用 (moisturizing effect), 优良的减少物理摩擦的润滑作用, 并且还提供优良的抗细菌入侵的保护作用等。透明质酸广泛用作化妆品的添加剂、关节炎的治疗剂、眼科手术的辅助剂以及外科手术后的粘附抑制剂等。奶牛的眼球、公鸡鸡冠、动物的缓冲组织、胎盘、癌细胞及皮肤等均含有大量透明质酸。

透明质酸可从上述生物组织中提取 (美国专利 No. 4,141,973 和美国专利 No. 4,303,676), 或通过发酵微生物作为发酵产品收集。然而, 提取获得的透明质酸含有诸如硫酸软骨素、硫酸葡糖胺聚糖等杂质, 从而需要复杂的纯化流程除去所述杂质, 因此生产成本高。但是, 按照使用微生物的生产透明质酸的方法, 其生产成本相对较低, 并且可通过较简单的方法获得高分子量的透明质酸(日本专利早期公开 No. 58-056692, 美国专利 86-00066)。

25 用于生产透明质酸的微生物包括脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)、粪链球菌 (Streptococcus faecalis)、停乳链球菌 (Streptococcus dysgalactiae)、兽瘟链球菌 (Streptococcus zooepidemicus)、马链球菌 (Streptococcus equi)、类马链球菌 (Streptococcus equisimilis) 等。根据伯吉氏手册 (Bergy's manual), 上述微生物属于兰氏 (Lancefield) 血清 A 组或 C 组。该微生物是溶血性链球菌, 并且据报道具有 β -溶血功能。

30 由于使用链球菌微生物 (日本专利早期公开 No. 58-566922、美

国专利早期公开 No. 60-500997、韩国专利注册公开 No. 10-250573 和韩国专利早期公开 No. 10-250573) 生产的透明质酸平均分子量较低, 仅为 300,000 ~ 3,500,000Da, 因此难以用作医疗剂或辅助剂, 并且对于化妆品其润肤力不足。此外, 美国专利 No. 6,090,596 描述了一种生产分子量为 6,300,000 ~ 9,500,000Da 的高分子量透明质酸的方法, 但透明质酸的生产率相当低, 仅为每升培养液 0.35g。

已知的使用微生物分离并纯化透明质酸的方法如下:

美国专利 No. 4,157,296 公开的一种纯化透明质酸的方法包括: 用三氯代乙酸处理脓链球菌的培养液以除去菌株, 然后用有机溶剂使其沉淀。然而, 由于使用有机溶剂的沉淀法需要大量重复操作, 因此其成本较高并且非常耗时。

美国专利 No. 4,782,046 描述的纯化方法包括: 向马链球菌的培养液中加入 0.01% 的硫酸月桂酯表面活性剂以分离附着在细胞壁上的透明质酸, 然后加入非离子表面活性剂溴化十六烷基三甲铵以形成透明质酸沉淀, 并用醇使其沉淀。

美国专利 No. 4,784,990 描述的纯化方法包括: 向兽瘟链球菌的培养液中加入乙醇使透明质酸从微生物中分离出来, 然后用氯代十六烷基吡啶使其沉淀。

日本专利早期公开 No. 63-012293 描述了一种通过使用大网状阴离子交换树脂 (Dianion HPA-25、HPA-75、IRA-900、IRA-904) 处理含透明质酸的溶液以除去分子量等于或小于 1,500,000Da 的低分子量透明质酸及发热物质的方法。

日本专利早期公开 No. 13-131503 描述的一种纯化透明质酸的方法包括: 用氧化铝或硅胶等处理含透明质酸的溶液以除去发热物质、蛋白质、核酸、金属杂质等, 并用有机溶剂使其沉淀。

日本专利早期公开 No. 06-199656 描述的一种纯化透明质酸的方法包括: 使含透明质酸的溶液通过在 pH 为 6 ~ 10 的溶液中带电荷的膜过滤器以除去发热物质并用醇使其沉淀。

韩国专利早期公开 No. 1994-2478 描述了一种通过向生产透明质酸的菌株培养液中加入铝酸铁粉末以纯化透明质酸的方法。

此外, 韩国专利早期公开 No. 1997-42603 描述的纯化透明质酸的方法包括: 用疏水性聚合物 (聚乙烯、聚丙烯或聚苯乙烯) 处理含透

明质酸的溶液，然后加入活性氧化铝并用醇使其沉淀。

然而，上述方法涉及复杂的处理过程，从而加大了生产成本，并且难以完全除去发热物质、蛋白质、核酸等。

发明内容

5 本发明的一个目的在于提供可以高产量生产高分子量透明质酸的微生物菌株。

本发明的另一个目的在于提供一种生产透明质酸的微生物菌株，所述微生物菌株不表达透明质酸酶并且不是溶血性的。

10 本发明的另一个目的在于提供由非溶血性微生物菌株生产的并经纯化的高分子量透明质酸。

本发明的另一个目的在于提供一种由微生物生产的透明质酸的纯化方法，该方法可以简单直接的方式除去发热物质并分离出高纯度的透明质酸。

15 为达到上述目的，本发明提供链球菌 KL0188 (KCTC1024BP)，该链球菌不表达透明质酸酶并且是非溶血性的。

本发明还提供一种纯化透明质酸及其盐的方法，该方法包括如下步骤：用芳族吸附树脂处理生产透明质酸的微生物菌株的培养液，用活性炭处理并用有机溶剂使其沉淀。

具体实施方式

20 本发明涉及生产透明质酸的微生物菌株和透明质酸的纯化方法。

根据本发明，提供一种通过在兽瘟链球菌中引起突变而制备的链球菌 KL0188。链球菌 KL0188 已于 2002 年 5 月 10 日由韩国典型菌种保藏中心 (Korean Collection for Type Culture) 保藏，保藏号为 KCTC10248BP。链球菌 KL0188 是一种非溶血性菌株，并且由于其没有透明质酸酶活性，因此可以高产量生产透明质酸。

25 链球菌 KL0188 可在含有诸如碳源、氮源、无机盐、维生素等微量成份的培养基中培养。葡萄糖、蔗糖、半乳糖、果糖可用作碳源，并优选使用葡萄糖。硝酸铵、硫酸铵、胰胨、蛋白胨、酵母提取物或酪蛋白氨基酸可用作氮源；氯化钠、磷酸钠、磷酸氢二钠、硫酸亚铁或硫酸镁可用作无机盐。

30 本发明所用的链球菌 KL0188 的培养基的实例包括：20~80g/L 的葡萄糖、5g/L 的酵母提取物、17g/L 的酪蛋白胨、7g/L 的谷氨酸、0.7g/L

的硫酸镁、2.5g/L的磷酸钾和5.0g/L的氯化钠。

链球菌 KL0188 可在 30~37℃ 的有氧条件下培养。培养液的 pH 优选维持在 6.5~7.5 的范围内，并且由于 pH 会在培养过程中变化，因此优选通过人工手段控制 pH。可使用 5N 的 NaOH 和 1N 的 HCl 溶液控制 pH。如果 pH 超出上述范围，透明质酸的产量和分子量可能有变化。

由链球菌 KL0188 生产的透明质酸可通过一般方法 (J. Soc. Cosmet. Japan. 22, 35~42 (1988)) 或通过本发明的纯化方法分离和纯化。链球菌 KL0188 产生约 6.0~7.5g/L 的透明质酸，其平均分子量高达 4,000,000Da 或以上。

因此，根据本发明，链球菌 KL0188 可以低成本、高产量生产透明质酸，并且透明质酸还可通过较简单的方法纯化。此外，由此生产的透明质酸可用于化妆品或医疗剂或辅助剂。

与现有的使用表面活性剂的透明质酸沉淀法不同，本发明的纯化方法包括如下步骤：生产透明质酸的微生物菌株的培养液经活性炭处理、芳族吸附树脂处理、超滤作用及乙醇沉淀作用。

从三菱公司购得的苯乙烯二乙烯苯型树脂可用作芳族吸附树脂。具体地说，所述树脂选自 HP10、HP20 (苯乙烯和二乙烯苯共聚物)、HP21、HP30、SP800、SP825、SP850、SP875、SP205、SP206 和 SP207 (溴化聚苯乙烯)，并优选使用 HP20 或 SP207。

任何将透明质酸作为代谢产物生成的菌株均可用作生产透明质酸的菌株，并且典型地，可使用链球菌。链球菌微生物包括脓链球菌、粪链球菌、停乳链球菌、兽瘟链球菌、马链球菌、类马链球菌和链球菌 KL0188 (KCTC10248BP)。生产透明质酸的菌株可通过一般的培养方法培养以制备含有透明质酸的培养液。

更具体地，透明质酸的纯化方法包括如下步骤：(a) 由生产透明质酸的菌株的培养液制备培养滤液；(b) 向培养滤液中加入芳族吸附树脂，搅拌，并进行超滤以制备透明质酸溶液；以及 (c) 向透明质酸的水溶液中加入有机溶剂以使透明质酸或其盐沉淀，并干燥沉淀。上述方法还包括在步骤 (a) 或 (b) 后向培养滤液或透明质酸的水溶液中加入活性炭并搅拌，然而除去活性炭。

在步骤 (a) 中，向培养液中加入硫酸月桂酯和福尔马林并搅拌，由此从细菌表面分离透明质酸并同时使细菌失活。然后，将培养液离

心以分离上层清液或过滤以得到滤液。

将培养滤液滴定到 pH 为 7.5~8.5 后进行步骤(b), 并加入 0.1~10wt% 的芳族吸附树脂。加入芳族吸附树脂后, 在 4~10℃ 搅拌混合滤液以吸附内毒素, 然后过滤以获得已除去吸附树脂的滤液。滤液经
5 超滤除去各种培养基组分和无机盐。可使用分子量截留值 (cut-off) 为 10,000~100,000Da 的滤膜进行超滤。

在步骤(c)中, 通过一般的有机溶剂沉淀法使透明质酸或其盐沉淀。诸如丙酮、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇或乙腈等水性有机溶剂可用作有机溶剂, 并优选使用乙醇。向透明质酸的水溶液中加入 NaCl 使
10 NaCl 浓度为 0.5~3M, 溶液过滤并向滤液中加入 1~5 倍于滤液体积的有机溶剂以沉淀透明质酸及其盐。然后用 70% 的乙醇洗涤沉淀并干燥。

活性炭处理可在步骤(a)或(c)后进行。具体而言, 向步骤(a)的培养滤液中或步骤(b)的透明质酸中加入 0.1~3(w/v) 的 NaCl, 然后加入 0.1~10(w/v) 的活性炭。活性炭用于吸附蛋白质或核酸以将其
15 除去。

与常规方法相比, 本发明的透明质酸的纯化方法可有效除去发热物质、蛋白质、核酸和金属杂质, 并可将有有机溶剂沉淀操作的频率降到最低, 从而通过简单经济的纯化方法制得高纯度的透明质酸。故而, 由本发明的纯化方法纯化的透明质酸纯度高达 99%, 并因此可用于化
20 妆品和药品。

参考下列实施例描述本发明。然而, 所述实施例仅用于示例本发明并且本发明并不受其限制。

实施例 1: 突变菌株的筛选

在兽瘟链球菌中引起突变以选择出具有非溶血性能并且无透明质酸酶活性的突变菌株。
25

将兽瘟链球菌 (KCTC 3318) 接种到 50ml 的从 DIFCO 公司购得的 Baco Todd Hewitt Broth 中并在 37℃ 培养直至出现代数生长期 (algebraic growth period)。然后, 取 1ml 的培养液在低温下离心以回收沉淀下来的细胞, 向其中加入 50mM 的 Tris-马来酸缓冲溶液 (pH
30 6.0) 并洗涤两次。

细胞以 1×10^3 个/ml 的浓度分散在缓冲溶液中, 使 NTG (N-甲基-N'-亚硝基胍) 以 200 μ g/ml 的浓度与上述溶液混合。混合物在 37

℃搅拌 30 分钟，然后用 50mM 的 Tris-马来酸缓冲溶液 (pH 6.0) 洗涤细胞两次。将细胞接种到 Todd Hewitt Broth 中并在 37℃培养 18 小时。得到的培养液用无菌盐水溶液稀释到浓度为 1×10^3 个细胞/ml，然后取 0.1ml 稀释溶液在血琼脂 (Blood Agar) 中培养以选择出不表现溶血性的菌落。

通过与上述相同的方法在选择出的非溶血性突变菌株上引起突变以选择无透明质酸酶活性的菌株。将非溶血性突变菌株涂覆在含有 400 μ g 透明质酸和 1% 白蛋白 V 组分的 Todd Hewitt Agar Broth 上以形成单菌落。在湿培养箱中于 37℃静置培养 (standing culture) 2 ~ 5 天，然后加入 10ml 2N 的醋酸盐溶液并静置 10 分钟。选择出表现出快速生长并大量形成粘性物质的菌落。

将选择出的菌落分别接种到 1.5L 的透明质酸生产培养基中，并在 35℃，pH 为 6.95 ~ 7.05 下有氧培养 20 小时。回收培养液并使用数字粘度计 (Brookfield DVII+, 4 转, 30rpm) 在 25℃测量绝对粘度。部分溶液用有机溶剂沉淀后溶于蒸馏水中，通过咋唑法 (Z. Dische, J. Biol. Chem. 167, 189 (1949)) 确定透明质酸的产量，从而选择出其培养液绝对粘度高并且透明质酸产量高的菌株。

通过分析 16S rDNA 的氨基酸序列 (Jukes, T. H. & C. R., (1969). In mammalian protein metabolism, 21 ~ 132 页; H. N. Munro 编辑. Saito, N. 和 Nei, M (1987) Mol Biol 第 4 卷, 406 ~ 425) 鉴别选择出的菌株。由此选择出的菌株经鉴别为链球菌，因而命名为链球菌 KL0188。链球菌 KL0188 于 2002 年 5 月 10 日由韩国典型菌种保藏中心保藏，保藏号为 KCTC10248BP。

实施例 2: 透明质酸生产率的检验

培养链球菌 KL0188 以测量透明质酸的生产效率以及所生产的透明质酸的分子量。

将分离出的微生物接种到 100ml 的 Todd Hewitt Broth 中并在 35℃培养直至出现代数生长期，然后将其用作第一种子培养液。将第一种子培养液接种到 1L 的胰酪胨培养液 (美国 Difco) 中并在 35℃培养直至出现代数生长期，然后将其用作第二种子培养液。

在 30L 的发酵罐中，加入含有 60g/L 的葡萄糖、5g/L 的酵母提取物、17g/L 的酪蛋白胨、7g/L 的谷氨酸、0.7g/L 的硫酸镁、2.5g/L

的磷酸氢二钾和 5.0g/L 的氯化钠的透明质酸生产培养基并灭菌,然后在其中接种 1000ml 的第二种子培养液。保持培养液的 pH 在 6.95~7.05 的范围内,温度为 35℃,换气量为 1.0VVM 的同时进行有氧培养。

培养过程中,取部分样品并测量培养液的粘度,继续培养直至粘度不再增大。通过测量确定培养液的粘度在培养 20 小时后不再增大,然后停止培养。最大粘度为约 20,000cps。

通过已知的分离和纯化方法 (J. Soc. Cosmet. Japan. 22, 35~42 (1988)) 回收存在于培养液中的透明质酸。通过咋唑法 (Z. Dische, J. Biol. Chem. 167, 189 (1947)) 测定透明质酸的量并通过毛细管粘度计法 (Narlin, Analytical Biochemistry 147, 347~395 (1985)) 测量所生产的透明质酸的平均分子量。结果,证实透明质酸的产量为 7.0g/L,其平均分子量为 5,500,000Da。

比较例 1: 兽瘟链球菌的透明质酸生产率的检验

通过实施例 2 中的方法培养兽瘟链球菌 (KCTC3318) 并测量透明质酸的生产率和分子量。

24 小时后,培养液的粘度不再增大并从而停止培养。测得的粘度为约 4000cps,透明质酸的生产率为 3.0g/L,其平均分子量为 2,500,000Da。

已证实与兽瘟链球菌相比,本发明的链球菌 KL0188 具有优良的透明质酸生产率并且所生产的透明质酸的分子量高。

本发明的链球菌 KL0188 是非溶血性菌株,并以高产量生产高分子量的透明质酸。因此,由链球菌 KL0188 生产的透明质酸可用于化妆品或药品。

实施例 3: 使用芳族吸附树脂 SP207 纯化透明质酸

3-1 生产透明质酸的菌株的制备

将链球菌 KL0188 (KCTC10248BP) 接种到 100ml 的 Todd Hewitt Broth 中并在 35℃ 培养直至出现代数生长期,然后将其用作第一种子培养液。将第一种子培养液接种到 1L 的胰酪胨豆胨培养液(美国 Difco) 中并在 35℃ 培养直至出现代数生长期,然后将其用作第二种子培养液。

向 30L 的发酵罐中加入 20L 含有 60g/L 的葡萄糖、5g/L 的酵母提取物、17g/L 的酪蛋白胨、7g/L 的谷氨酸、0.7g/L 的硫酸镁、2.5g/L 的磷酸氢二钾和 5.0g/L 的氯化钠的透明质酸生产培养基并灭菌,然后

在其中接种 1000ml 的第二种子培养液。在 pH 为 6.95 ~ 7.05，温度为 35℃ 下培养 20 小时。

3-2 培养滤液的制备

5 稀释透明质酸培养液使透明质酸的浓度变为 0.1 ~ 0.2%。向其中加入 0.02% 的硫酸月桂酯和 0.05% 的福尔马林溶液并搅拌 3 小时。然后，通过离心或过滤除去细菌以制备培养滤液。

3-3 SP207 树脂处理

10 滴定培养滤液使其 pH 变为 7.5 ~ 8.5，加入 3(w/v)% 的芳族吸附树脂 SP207，在 4 ~ 10℃ 搅拌 3 小时以吸附发热物质。然后，过滤经吸附树脂处理过的溶液即得到已除去吸附树脂的滤液，并进行超滤。

3-4 活性炭处理

向滤液中加入 0.9(w/v)% 的 NaCl 和 3(w/v)% 的活性炭并搅拌 2 小时以使蛋白质和核酸等吸附到活性炭中。然后，过滤即得到已除去活性炭的透明质酸水溶液。

15 3-5 乙醇沉淀

向透明质酸水溶液中加入 NaCl 以使其浓度变为 1M，然后用 0.2 μm 的过滤器过滤溶液。接着，加入 1.5 ~ 3 倍于溶液体积的乙醇以沉淀透明质酸及其盐，然后用 70% 的乙醇洗涤数次。在无菌条件下干燥沉淀即得到透明质酸及其盐。

20 实施例 4: 使用芳族吸附树脂 HP20 纯化透明质酸

通过实施例 3 中相同的方法纯化透明质酸及其盐，但使用 HP20 作为吸附树脂。

实施例 5: 在活性炭处理后使用芳族吸附树脂 SP207 纯化透明质酸

25 通过实施例 3 中相同的方法纯化透明质酸及其盐，但在活性炭处理后进行 SP207 吸附。

实施例 6: 在活性炭处理后使用芳族吸附树脂 HP20 纯化透明质酸

通过实施例 4 中相同的方法纯化透明质酸及其盐，但在活性炭处理后进行 HP20 吸附。

实施例 7: 使用 SP207 纯化透明质酸

30 通过实施例 3 中相同的方法纯化透明质酸及其盐，但使用兽瘟链球菌 (KCTC3318) 作为生产透明质酸的菌株。

比较例 2

通过实施例 3 中相同的方法纯化透明质酸及其盐，但省略芳族树脂吸附步骤。

实验例：透明质酸纯化产量的测量

5 测量由实施例 3~7 及比较例的方法纯化的透明质酸及其盐的纯度。

A. 透明质酸的产量：通过改进的吡唑法测定透明质酸的产量，并对初始体积和最终体积进行比较。

10 B. 发热物质的测量：将透明质酸及其盐溶于含有等于或小于 0.001EU/ml 发热物质的水中使其密度变为 1.5g/L，然后使用从 Charles River Endosafe 购得的 LAL（鲎试剂，Limulus Amebocyte Lysate）按照该产品所附手册进行分析。分析值以每毫克透明质酸中存在的内毒素单位（EU）表示。

C. 纯度试验：通过吡唑法（Anal. Biochem., 4, 330 (1962)）进行纯度试验。

15 D. 蛋白质含量：通过劳拉法（Lowry method）测量蛋白质的含量。

E. 核酸含量：将透明质酸及其盐溶于盐水溶液中使其浓度为 1%，然后在 260nm 测量其吸光度。

结果如下表 1 所示。

(表 1)

测量项目	结果						
	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6	实施例 7	比较例 2	
产量	78 %	80 %	82 %	79 %	78 %	79 %	
纯度 (%)	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	95	
发热物质 (EU/mg)	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	0.1	
蛋白质 (%)	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	0.2	
核酸	未测到	未测到	未测到	未测到	未测到	0.1 %	
分子量(百万 Da)	5.3	5.2	5.5	5.4	2.5	5.4	
金属 离子	铁 (ppm)	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
	铅 (ppm)	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm
	砷 (ppm)	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm	<1ppm

20 从表 1 中可看出，由实施例 1~7 纯化的透明质酸及其盐纯度高达

99%。而同时，由比较例纯化的透明质酸纯度仅为95%。此外，实施例3~7的透明质酸及其盐中发热物质、蛋白质和核酸的含量比比较例低很多。