

# 透明质酸的发酵及提取工艺

汪江波 黄金明 张晶

湖北工业大学发酵工程省部共建教育部重点实验室, 武汉 430068

**摘要** 采用诱变筛选获得的马疫链球菌 EF02, 发酵后透明质酸(hyaluronic acid, HA)的产量达 3.05 g/L, 通过单因素及正交试验摇瓶培养优化发酵培养基, 再经 15 L 发酵罐发酵, 发酵后 HA 的产量为 3.47 g/L, 与 EF02 优化处理前相比, 提高了 13.77%; 通过对发酵条件优化, 发酵后 HA 的产量为 3.66 g/L, 与 EF02 优化处理前相比, 提高了 20.0%。对产物 HA 进行分离纯化, HA 提取率达 98.36%, HA 纯度达 91.28%, 蛋白质残留率为 0.97%。

**关键词** 透明质酸; 马疫链球菌; 发酵; 分离纯化

**中图分类号** Q 939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0648-06

透明质酸(hyaluronic acid, HA)化学名称为糖醛(玻璃)酸, 它是以 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖单体为结构单元, 通过  $\beta$ -1,4 糖苷键反复交替连接而形成的链状高分子酸性粘多糖<sup>[1]</sup>。HA 通常溶于水, 不溶于醇、酮、乙醚等有机溶剂, 具有保湿、抗衰老、润滑等功能, 广泛用于日化、保健食品、医药等领域; 如在医药领域, HA 在药物中可作为药物载体<sup>[2]</sup>, 可将各类药物靶向送至病理部位, 具有促进骨折愈合及一定抗癌作用等功效。

链球菌可产 HA, A 族链球菌有较强的侵袭力, 可产生多种酶和外毒素。吴涛<sup>[3]</sup>对猪链球菌致病性进行过相关研究。笔者以 *Streptococcus equin* 为出发菌, 经诱变获得无致病性高产菌株 EF02, 经 15 L 发酵罐发酵, 通过对发酵培养基及发酵条件进行优化, 使得 HA 产量显著提高; 同时对发酵液进行预处理, 对目的产物 HA 进行了分离纯化研究, 以探讨一套在扩大培养过程中提高 HA 产量和品质的发酵及提取工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1) 菌种。 *Streptococcus equin* EF02, 由笔者所在实验室诱变选育获得。发酵液, 取自 15 L 发酵罐。

2) 培养基。种子培养基: 马丁肉汤 20 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 3 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2 g/L,

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L, 葡萄糖 10 g/L; 调 pH 值为 7.4, 116 °C 灭菌 30 min。发酵培养基: 蔗糖 50 g/L, 混合氮源 100 g/L, 葡萄糖 10 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 1 g/L; 调 pH 值为 7.4, 116 °C 灭菌 30 min。

### 1.2 培养方法

1) 种子培养。取斜面菌种 1~2 环转接到装液体积比为 50 mL /300 mL 三角瓶中, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 16 h。

2) 摇瓶培养。将制备好的种子液按体积分数 10% 的接种量转接到装有 100 mL 发酵培养基的 300 mL 三角瓶中, 37 °C, 250 r/min, 发酵培养 44 h。

3) 发酵培养。将培养好的种子液按体积分数 10% 的接种量转接到 15 L 发酵罐中, 37 °C, 250 r/min, 发酵培养 44 h。

### 1.3 测定方法

1) 透明质酸含量的测定。采用 Bitter-Muir 氏咔唑法<sup>[4]</sup>。

2) 透明质酸相对分子质量的测定。采用 Laurent 等<sup>[5]</sup>的方法。

3) HA 得率的计算。

HA 得率(%) = (处理后 HA 含量 × 样品液体积) / (处理前 HA 含量 × 样品液体积) × 100

4) 蛋白质含量的测定。Bradford 染料结合法 (dye binding method)<sup>[6-7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基多因素正交优化

前期单因素试验表明,蔗糖为最佳碳源,葡萄糖

和蔗糖质量比在 1 : 10 时为最佳复合碳源,酵母浸膏、牛肉浸膏、蛋白胨质量比为 2 : 1 : 1 时效果最好。在此基础上,通过 7 因素 3 水平正交试验对培养基组成进行了优化,摇瓶发酵结果见表 1。

表 1 发酵培养基多种因素正交优化<sup>1)</sup>

Table 1 Multi-factor orthogonal optimization of fermentation medium

序号 No.	蔗糖(A) Saccharose	葡萄糖(B) Glucose	复配氮源(C) Compound nitrogen source	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (D)	NaHCO <sub>3</sub> (E)	UDP (F) Uridine diphosphate	谷氨酸(G) Glutamic acid	HA 产量 Output of HA
1	25	5	55	1.0	0.8	0.01	0.01	1.36
2	25	10	75	1.5	1.6	0.05	0.02	2.18
3	25	15	95	2.5	2.4	0.09	0.03	3.05
4	45	5	55	1.5	1.6	0.09	0.03	0.97
5	45	10	75	2.5	2.4	0.01	0.01	3.01
6	45	15	95	1.0	0.8	0.05	0.02	3.29
7	65	5	75	1.0	2.4	0.05	0.03	0.67
8	65	10	95	1.5	0.8	0.09	0.01	1.53
9	65	15	55	2.5	1.6	0.01	0.02	1.46
10	25	5	95	2.5	1.6	0.05	0.01	1.21
11	25	10	55	1.0	2.4	0.09	0.02	1.08
12	25	15	75	1.5	0.8	0.01	0.03	3.09
13	45	5	75	2.5	0.8	0.09	0.02	3.37
14	45	10	95	1.0	1.6	0.01	0.03	3.23
15	45	15	55	1.5	2.4	0.05	0.01	2.72
16	65	5	95	1.5	2.4	0.01	0.02	0.54
17	65	10	55	2.5	0.8	0.05	0.03	1.54
18	65	15	75	1.0	1.6	0.09	0.01	1.87
k1	1.995	1.370	1.522	1.933	2.380	2.132	1.950	
k2	2.798	2.112	2.382	1.838	1.837	1.935	2.003	
k3	1.268	2.580	2.158	2.290	1.845	1.995	2.108	
R	1.530	1.210	0.860	0.452	0.543	0.197	0.158	

1) k:均值 Mean value; R:极差 Range. 下同 The same as below.

据表 1 由极差 R 大小分析可得,最佳发酵培养基配方为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub>F<sub>1</sub>G<sub>3</sub>,即当发酵培养基中蔗糖添加量为 45 g/L、葡萄糖 15 g/L、复配氮源 75 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L、NaHCO<sub>3</sub> 0.8 g/L、UDP 0.01 g/L 及谷氨酸 0.03 g/L 时,最适宜 HA 发酵生产。在此正交试验优化后的发酵培养基的基础上,于 15 L 发酵罐中发酵,测得 HA 产量为 3.42 g/L,与对照 EF02 优化处理前相比,产量提高了 12.13%。

### 2.2 金属离子对发酵产 HA 的影响

在上述正交试验优化得到最佳发酵培养基的基础上,考察金属离子 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 对发酵培养基产 HA 的影响,摇瓶发酵结果见表 2。

由表 2 极差 R 及均值分析可得,最佳搭配为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>1</sub>,即当发酵培养基中 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 添加量为 2 g/L, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 为 0.2 g/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 为 0.05 g/L 时为最佳产酸条件,通过发酵后测得 HA 产量为 3.47 g/L,在产酸 3.42 g/L 基础上 HA 产量仅提高了 1.46%,与添加前的 3.42 g/L

表 2 金属离子 Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> 对发酵产 HA 的影响

Table 2 Effects of metal ions Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> to HA fermentation

序号 No.	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (A)	MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O(B)	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O(C)	HA 产量 Output of HA
1	1	0.2	0.05	3.13
2	1	0.3	0.10	2.41
3	1	0.4	0.15	1.37
4	2	0.2	0.10	3.42
5	2	0.3	0.15	2.54
6	2	0.4	0.05	3.15
7	3	0.2	0.15	2.26
8	3	0.3	0.05	2.85
9	3	0.4	0.10	1.44
k1	2.470	3.137	3.210	
k2	3.070	2.600	2.457	
k3	2.183	1.987	2.057	
R	0.887	1.150	1.153	

无显著差异,因此金属离子不作为培养基的组成。

### 2.3 发酵工艺条件优化

1)不同发酵阶段溶氧量(转速)对产 HA 的影响。在发酵前期、中期及后期不同的 3 个阶段通过变换转速的方式来改变溶氧量,其对发酵产 HA 的影响结果见表 3。由表 3 极差 R 分析可以得出,最

佳优化组合为  $A_2B_3C_2$ , 在此优化组合下进罐发酵后测得 HA 产量为 3.49 g/L, 与对照 EF02 优化处理前相比, 产量提高了 14.43%。

表 3 发酵不同阶段溶氧量(转速)对发酵产 HA 的影响

Table 3 Impact of the amount of dissolved oxygen (speed) on the production of HA in different stages of fermentation

序号 No.	前期转速(A) Early speed/ (r/min)	中期转速(B) Medium speed/(r/min)	后期转速(C) Late speed/ (r/min)	HA 产量 Output of HA/(g/L)
1	150	200	180	1.16
2	150	250	230	1.89
3	150	300	280	1.96
4	200	200	230	3.01
5	200	250	280	2.57
6	200	300	180	3.44
7	250	200	280	2.37
8	250	250	180	2.81
9	250	300	230	3.05
k1	1.670	2.180	2.470	
k2	3.007	2.423	2.650	
k3	2.743	2.817	2.300	
R	1.337	0.637	0.350	

2) pH 值对发酵产 HA 的影响。本次试验考察的是不同初始的 pH 值对发酵产 HA 的影响, 其结果如图 1 所示。

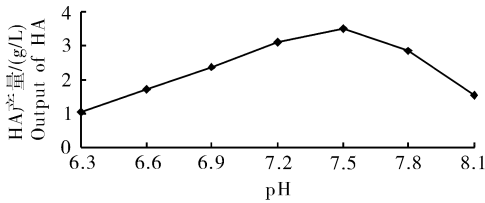


图 1 不同初始的 pH 值对发酵产 HA 的影响  
Fig. 1 Impact of different initial pH value on the production of HA fermentation

由图 1 可知, HA 产量随着 pH 值的变化先递增后递减, 最高点在 pH 值 7.5 处, 因此 pH 值为 7.5 时最适合生产 HA, pH 值偏高或偏低均影响菌体的生长及 HA 合成酶的活性。

3) 不同发酵阶段温度对产 HA 的影响。在发酵的初期、中期及后期分别改变温度, 其对发酵产 HA 的影响见表 4。

由表 4 中极差 R 分析可得出, 最佳组合是  $A_3B_2C_2$ , 即发酵温度前期为 37 °C, 中期为 35 °C, 后期为 35 °C 时发酵产 HA 最适宜。在此优化温度下进罐发酵测定 HA 产量为 3.55 g/L, 较之前有较大提高。原因是, 在发酵初期 37 °C 培养可以使菌体较快地生长繁殖, 为发酵中后期打好产酸基础; 发酵中后期适当降低温度更有利于 HA 的合成及积累。

表 4 不同发酵阶段温度对产 HA 的影响

Table 4 Impact of temperature on the production of HA in different stages of fermentation

序号 No.	前期发酵(A) Pre- fermentation/°C	中期发酵(B) Fermentation medium/°C	后期发酵(C) Post- fermentation/°C	HA 产量 Output of HA/(g/L)
1	33	33	33	1.48
2	33	35	35	2.41
3	33	37	37	1.43
4	35	33	35	3.04
5	35	35	37	2.16
6	35	37	33	2.89
7	37	33	37	2.07
8	37	35	33	3.54
9	37	37	35	3.52
k1	1.773	2.197	2.637	
k2	2.697	2.703	2.990	
k3	3.043	2.613	1.887	
R	1.270	0.506	1.103	

4) 接种量对发酵产 HA 的影响。种子液按不同的体积分数分别转接到 15 L 发酵罐, 发酵后分别测定 HA 的产量, 其结果如图 2 所示。

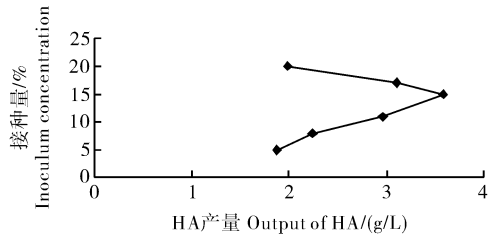


图 2 接种量对发酵产 HA 的影响

Fig. 2 Impact of inoculum concentration on the production of HA fermentation

由图 2 可看出, 接种量在 5%~20% 时, HA 产量先递增后递减, 接种量在 15% 时, HA 产量达到最高。原因是接种量过少, 培养基浪费严重; 接种量过多, 会造成培养基中溶氧及营养物质的缺乏, 不利于菌体的生长, 进而影响 HA 产率的提高。

5) 发酵时间对发酵产 HA 的影响。种子液转接到 15 L 发酵罐后, 对不同时间的发酵液分别取样测定, 其对 HA 产量的影响结果如图 3 所示。

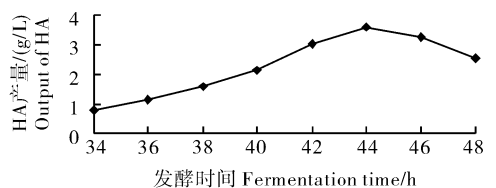


图 3 发酵时间对发酵产 HA 的影响

Fig. 3 Impact of time on the production of HA fermentation

由图 3 可以看出, HA 的产量先是随着发酵时间的增加而递增, 在发酵时间为 44 h 时达到最高水平, 随后就逐渐下降。其原因是发酵时间过短影响 HA 的合成量, 时间过长 HA 易降解。

6) 多因素正交试验优化发酵条件。pH 值、接种量及发酵时间等 3 因素对发酵条件的优化非常重要, 对该 3 因素的正交优化结果见表 5。由表 5 中极差分析可得, 最佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>, 即当 pH 值为 7.5, 发酵时间 45 h, 接种量 14% 时, 为最佳发酵条件。在此最佳发酵条件和最佳发酵培养基条件下进罐发酵, HA 产量达 3.66 g/L, 较 EF02 优化处理前提高了 20.0%。其原因是 pH 值相比发酵时间及接种量对菌体生长和代谢影响最大, 继而影响 HA 产量的提高。

表 5 3 因素正交试验优化发酵条件

Table 5 Optimization of three orthogonal factors for fermentation conditions

序号 No.	pH (A)	接种量(B) Inoculum concentration/%	发酵时间(C) Fermentation time/h	HA 产量 Output of HA/(g/L)
1	7.4	13	43	1.53
2	7.4	14	44	1.89
3	7.4	15	45	2.07
4	7.5	13	44	2.44
5	7.5	14	45	3.62
6	7.5	15	43	2.85
7	7.6	13	45	3.64
8	7.6	14	43	2.18
9	7.6	15	44	1.93
k1	1.830	2.537	2.187	
k2	2.970	2.563	2.087	
k3	2.583	2.283	3.110	
R	1.140	0.280	1.023	

2.4 发酵液的预处理

1) 发酵液中菌体的去除。试验考察了发酵液除菌方法的选择, 对热处理法温度、酸处理法 pH 值、离心速率分别进行了单因素试验, 并分别测出每组 HA 的得率, 其结果见图 4、图 5 及图 6。

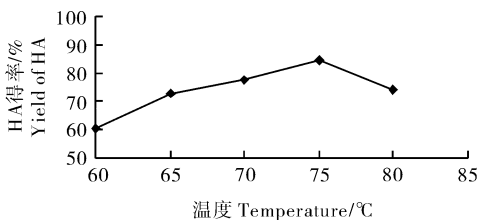


图 4 热处理时温度对 HA 得率的影响

Fig. 4 Impact of temperature on the yield of HA during heat treatment

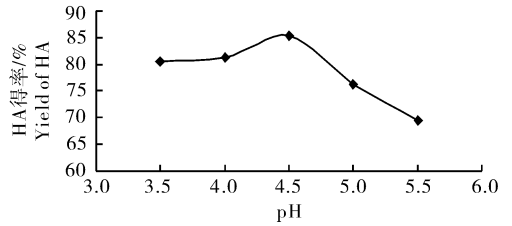


图 5 酸处理时 pH 值对 HA 得率的影响

Fig. 5 Impact of pH value on the yield of HA in the acid treatment time

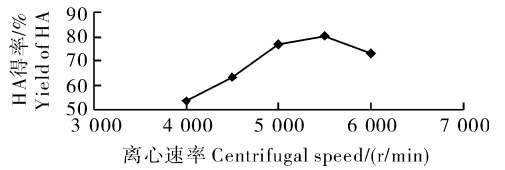


图 6 离心速率对 HA 得率的影响

Fig. 6 Impact of centrifugal speed on the yield of HA

由图 4、图 5 及图 6 可看出, 当热处理温度 75 °C, 酸处理 pH 值 4.5, 离心速率 5 000 r/min 时, HA 得率分别达到最高。对比图 4、图 5、图 6 中 HA 的得率可知, 酸处理略好于热处理, 均比单一离心处理效果要好。其中, 酸处理法 pH 值为 4.5 时, 在 3 类方法中除菌效果最好。

2) 发酵液中蛋白质的去除。试验考察了去除发酵液中蛋白质的方法, 对加热法的温度、冷藏法的温度、有机溶剂添加体积的选择, 分别进行了单因素试验, 并分别测定出每组 HA 的得率和蛋白质的去除率, 其结果如图 7、图 8 及图 9 所示。

根据图 7~9 结果对照考虑, 3 类除蛋白质方法中, 选择加热法在温度 90 °C, 效果最优。

2.5 HA 的分离提取

1) 乙醇沉淀法。试验考察了乙醇的添加体积倍数及沉淀时间对 HA 提取率和 HA 纯度的影响, 其结果如图 10、图 11 所示。

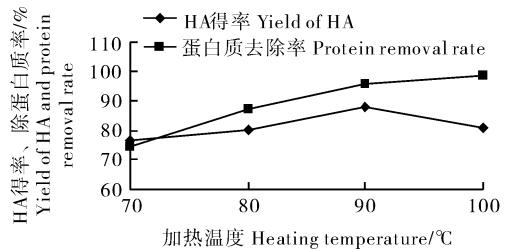


图 7 温度对蛋白质去除率、HA 得率的影响

Fig. 7 Impact of temperature on the removal of protein and yield of HA

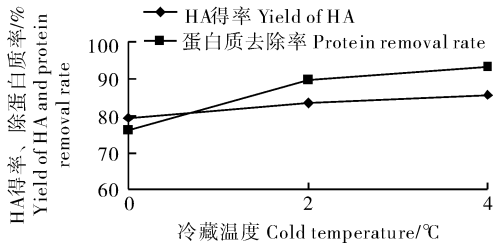


图 8 冷藏温度对蛋白质去除率、HA 得率的影响  
Fig. 8 Impact of refrigeration temperature on the removal of protein and yield of HA

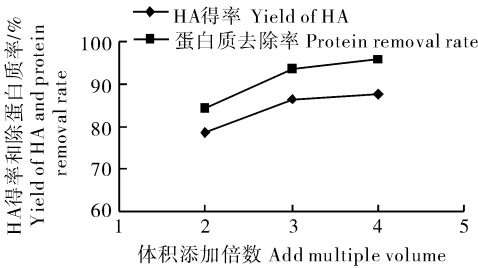


图 9 氯仿体积添加倍数对蛋白质去除率、HA 得率的影响  
Fig. 9 Impact of volume of a multiple of the volume of chloroform on the removal of protein and yield of HA

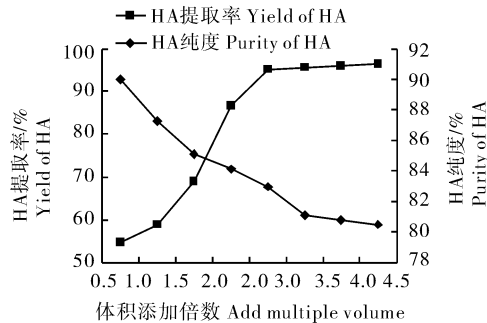


图 10 乙醇体积添加倍数对 HA 提取率和 HA 纯度的影响  
Fig. 10 Impact of multiples of volume of ethanol added on the HA extraction rate and purity of HA

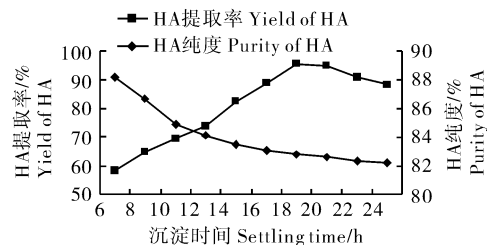


图 11 沉淀时间对 HA 提取率和 HA 纯度的影响  
Fig. 11 Impact of multiples of settling time on the HA extraction rate and purity of HA

根据图 10、11 结果可知,采用乙醇沉淀法分离提取 HA 时,乙醇添加体积为发酵液 3 倍、沉淀时间为 18 h 时,效果最好。

2) 高速离心法。试验考察了高速离心转速对 HA 提取率和 HA 纯度的影响,其结果如图 12 所示。由图 12 可看出,离心转速选择 16 000 r/min 为宜。综合分析可知,乙醇沉淀法与高速离心法分离 HA 的效果相近。

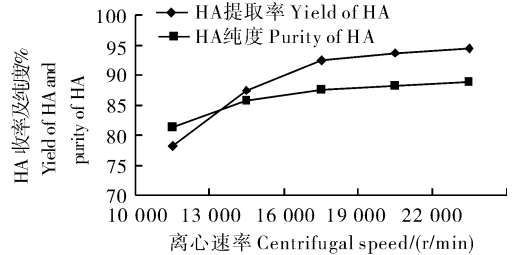


图 12 离心转速对 HA 提取率和 HA 纯度的影响  
Fig. 12 Impact of centrifugal speed on the HA extraction rate and purity of HA

## 2.6 HA 的纯化

试验选取了 NaCl 浓度、pH 值、CPC 质量分数及静置时间等 4 因素作为 CPC 法纯化 HA 的条件,以  $L_9(3^4)$  设计正交试验,并分别计算 HA 的提取率、纯度和蛋白质的残留率。

表 6 影响 CPC 纯化 HA 的 4 因素 3 水平试验设计

水平 Level	因素 Factors			
	NaCl 浓度 Concentration of NaCl/(mol/L)	pH	CPC 质量分数 Mass fraction of CPC/%	静置时间 Standing time/h
1	0.3	6	3	1
2	0.4	7	4	3
3	0.5	8	5	5

正交试验结束后分别测定 HA 的提取率、纯度和蛋白质的残留率,计算后根据极差分析得出,选取 NaCl 浓度为 0.3 mol/L、pH 值为 7.0、CPC 质量分数为 4%、静置时间为 1 h 的组合较佳。在此组合下,HA 提取率可达 98.36%,HA 纯度达 91.28%,蛋白质残留率为 0.97%,平均相对分子质量达  $1.02 \times 10^6$ 。

## 3 讨论

对 *Streptococcus equin* EF02 的发酵培养基进行单因素试验及多因素正交试验优化,得到最佳组合发酵培养基,在此发酵培养基条件下进 15 L 发酵罐发酵,测得 HA 产量达 3.47 g/L。本试验只是对发酵培养基进行了优化,产量离工业化生产要求还存在相当差距,如能进一步对菌种营养条件进行研究,提高菌种生长状况及 HA 的合成能力,或许可



实现更高产量的发酵结果。徐姮等<sup>[8]</sup>在对考克氏菌产木聚糖酶的发酵条件进行优化的研究中,得出通过设定不同培养条件可以改变菌株的生长状况以及可影响产物产量,故对菌种营养条件的进一步研究十分必要。

对 *Streptococcus equin* EF02 发酵条件优化试验,得最优发酵条件为:初始 pH 值 7.5,接种量 14%,发酵时间 45 h;发酵前期转速 200 r/min,中期 300 r/min,后期 230 r/min;发酵前期温度 37℃,中期 35℃,后期 35℃。HA 产量较优化前提高了 20.0%,但产量仍然偏低,原因是分批发酵转化率低,有底物抑制、葡萄糖效应、代谢阻碍等问题,不适合投入工业化的生产。武薇等<sup>[9]</sup>对透明质酸补糖分批发酵工艺进行了研究,发现通过分批补加葡萄糖较分批发酵时 HA 产量提高 90%,因此,有待于对补料或连续发酵方面进行相关研究。若进一步建立发酵动力学模型,对更好地调控发酵参数意义颇大。

发酵液经预处理后,通过单因素试验及正交设计试验优化,得出 HA 分离纯化最佳的方法组合为:先采用乙醇沉淀法沉淀 HA,乙醇添加体积为 3 倍、沉淀时间为 18 h,离心取沉淀溶解盐溶液中后,再采用 CPC 法进一步纯化 HA,综合考虑,选取 NaCl 浓度为 0.3 mol/L、pH 值为 7.0、CPC 质量分数为 4%、静置时间为 1 h 时效果最好,HA 纯度达 91.28%,提取率达 98.36%,蛋白质残留率为 0.97%。CPC 法用于直接沉淀发酵液,用量大、成本高,以及乙醇沉淀法不仅用量多,还存在操作的安全

性问题,故可在分离纯化方法遴选、优化组合及降低生产成本方面进行进一步研究,或加强新提取工艺的开发,在完善传统工艺的同时,可尝试使用离子交换、膜过滤、亲和层析等新的分离技术来进行分离纯化工作。

## 参 考 文 献

- [1] JOG R, SHREENATH P, TEK C B. Rhodococcus rhodochrous PA-34: a potential biocatalyst for acrylamide synthesis[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1359-1363.
- [2] 单连海, 熊雄, 郭海霞. 透明质酸的制备及其应用进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3150-3151, 3189.
- [3] 吴涛. 猪链球菌 2 型 *revS* 基因缺失株构建及 HYL 蛋白与宿主互作研究[D]. 武汉: 华中农业大学生命科学技术学院, 2008, 17-108.
- [4] BITTER T, MUIR H M. A modified uronic acid carbazole reaction[J]. Anal biochem, 1962, 4(4): 330-334.
- [5] AURENT T C, RYAN M, PIETRUSZKIEWICZ A. Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronan acid from the bovine vitreous body[J]. Biochem Biophys, 1960, 42: 491-495.
- [6] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] DRYRE R L, LATA G F. Experimental biochemistry[M]. New York: Oxford University Press, 1989: 346-347.
- [8] 徐姮, 李婵娟, 洪玉枝. 考克氏菌木聚糖酶发酵条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 701-704.
- [9] 武薇, 杜连祥, 路福平, 等. 透明质酸补糖分批发酵工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 108-111.

## Fermentation and Extraction of Hyaluronic Acid

WANG Jiang-bo HUANG Jin-ming ZHANG Jing

The MOE (Ministry of Education) Key Laboratory of Fermentation Engineering,  
Hubei University of Technology, Wuhan 430068 China

**Abstract** *Streptococcus equin* EF02 yielding 3.05 g/L HA was obtained through mutation and screening. After optimizing with single factor and orthogonal experiments, the fermentation medium was put into the 15 L fermentor. The yield of HA was 3.47 g/L, increasing by 13.77% compared with EF02 before optimization. It produced HA 3.66 g/L under the optimized fermentation conditions, increasing 20.00% comparing with EF02 before optimization. HA products were isolated and purified. The results showed that the extraction rate of HA, purity and the residual rate of protein was 98.36%, 91.28%, 0.97%, respectively.

**Key words** hyaluronic acid; *Streptococcus equin*; fermentation; isolation and purification

(责任编辑:陆文昌)