全细胞催化提取猪胆汁中猪去氧胆酸的工艺优化

焦守峰[1,2]，赵　露[2]，郭　庆[1,2*]，徐宾朋[2]
（1. 淮北职业技术学院，安徽淮北 235000；2. 安徽科宝生物工程有限公司，安徽淮北 235000）

摘要：该研究以提取胆红素后的猪胆汁为起始原料，采用全细胞催化水解、成镁盐及精制工艺制备猪去氧胆酸，并采用正交试验，对全细胞催化水解、成镁盐、乙酸乙酯精制步骤的关键工艺参数进行优化。最终确定优化条件为：全细胞菌液用量为 1.0%，于 pH 7.0、37 ℃条件下水解；硫酸镁用量为 1.5%，于 pH 9.0 ～ 10.0、55 ℃制备镁盐；乙酸乙酯用量为 8 倍质量，于 pH 6.0 条件下回流 1 h 精制。以优化工艺制备的猪去氧胆酸提取率可达 90%，熔点为 195 ℃，说明该工艺稳定、可控，适合工业化生产。

关键词：猪胆汁；猪去氧胆酸；全细胞催化；提取；精制
中图分类号：R284.2；TQ461　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)03-0332-05
引用：焦守峰, 赵　露, 郭　庆, 等. 全细胞催化提取猪胆汁中猪去氧胆酸的工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(3): 332-336. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.03.010

Optimization of the Whole-cell Hydrolysis Process for Extraction of Hyodeoxycholic Acid from Porcine Bile

JIAO Shoufeng[1,2], ZHAO Lu[2], GUO Qing[1,2*], XU Binpeng[2]
(*1. Huaibei Vocational & Technical College, Huaibei 235000; 2. Anhui Chem-Bright Bioengineering Co., Ltd., Huaibei 235000*)

ABSTRACT: In this study, using porcine bile after bilirubin extraction as the starting material, hyodeoxycholic acid was prepared via whole-cell hydrolysis, magnesium salt formation, and subsequent purification. Orthogonal experiments were employed to optimize the key process parameters of whole-cell hydrolysis, magnesium salt precipitation, and ethyl acetate refining. The optimal conditions were determined as follows: hydrolysis was performed at 37 ℃ and pH 7.0 with 1.0% whole-cell bacterial suspension; magnesium salt was prepared at 55 ℃ and pH 9.0 – 10.0 with 1.5% magnesium sulfate; purification was carried out by refluxing with 8-fold mass of ethyl acetate at pH 6.0 for 1 h. By the optimized process, the extraction yield of hyodeoxycholic acid reached up to 90 %, with a melting point of 195 ℃. These results indicate that this process is stable, controllable, and suitable for industrial production.

Key Words: porcine bile; hyodeoxycholic acid; whole-cell hydrolysis; extraction; refining

猪去氧胆酸（hyodeoxycholic acid，HDCA，图 1）是从猪胆汁（猪胆粉）中提取的有效成分之一，是人工牛黄的重要原料，也是清开灵注射剂中的有效成分[1]。HDCA 具有诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖的作用，对急性白血病的治疗效果良好，且具有抗抑郁作用[2]。同时，HDCA 也是半合成熊去氧胆酸医药中间体的原料[3-5]。

传统的 HDCA 生产方式均需要经过强碱皂化[6-7]，将结合型的甘氨猪去氧胆酸和牛黄猪去氧胆酸裂解为游离型 HDCA 后，加双氧水脱色，酸化得 HDCA 粗品，再用乙酸乙酯重结晶，即得熔点为 170 ℃的 HDCA；随后，通过精制，可获得熔点

收稿日期：2025-11-17
基金项目：安徽省教育厅自然科学基金重大项目（2025AHGXZK20094）、淮北市“生物法绿色高效制备医药中间体猪去氧胆酸产业创新团队”项目（202308）
作者简介：焦守峰，副教授，从事天然物质分离、提纯与分析的研究。
通信作者：郭　庆，副研究员，从事动物脏器中有效成分提取工艺的研发与产业化研究。

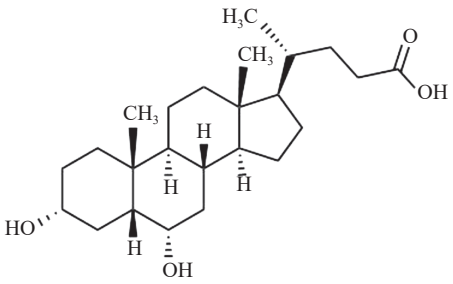


图 1 HDCA 的化学结构

Fig.1 Chemical Structure of HDCA

为 195 ℃的 HDCA。以 HDCA 为原料的精制通常采用乙酸乙酯反复重结晶法[8]；也可通过甲酯化 - 苯加成法，利用不同的胆汁酸甲酯与苯加成物在苯中的溶解度差异，分离猪去氧胆酸甲酯 - 苯加成物，再用碱分解加成物，调节 pH 值，获得 HDCA 纯品[9]。此外，全细胞催化水解技术已被用于从鸡胆汁中提取鹅去氧胆酸[10]。本实验室构建了表达胆盐水解酶的大肠埃希菌，并将所构建的基因工程菌与猪胆汁共孵育，通过酶催化水解作用将结合型 HDCA 转化为游离型 HDCA。该技术可替代传统的皂化工艺，避免高温、强碱条件。本研究采用正交设计优化了全细胞催化水解工艺、成镁盐工艺以及后续精制工艺，并对优化工艺进行了产业化生产验证。

1 仪器与试剂

LC-2030 Plus 型高效液相色谱仪（日本岛津公司）；R-1005 型旋转蒸发仪（郑州长城科工贸有限公司）；PHS-3A 型 pH 检测仪（上海仪电科学仪器股份有限公司）；WZZ 型旋光仪（上海精密科学仪器有限公司）；WRS-2 型微机熔点仪（上海易测仪器设备有限公司）；DHG-9140A 型鼓风干燥箱（上海慧泰仪器制造有限公司）。

猪胆（临沂新程金锣肉制品集团有限公司，批号 CJ250303、CJ250305、CJ250310、CJ250408、CJ250512、CJ250513、CJ250514、CJ250605、CJ250605）；基因工程菌液（安徽科宝生物工程有限公司，批号 CK241120、CK250512）；HDCA 对照品（中国食品药品检定研究院，含量 99.7%，批号 10087-201411）；氢氧化钠、浓硫酸、乙酸乙酯、硫酸镁等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HDCA 浓度的 HPLC 检测法

色谱条件：色谱柱 ODS-3 C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.1 mol/L 乙酸水溶液和乙腈（体积比 49 ∶ 51），等度洗脱；检测波长 210 nm；柱温 35 ℃；流速 1.0 mL/min；进样量 10 μL。

对照品溶液配制：取 HDCA 对照品 25 mg 置 10 mL 量瓶中，用体积分数为 1%的乙酸 - 甲醇溶液定容，摇匀即得。

样品溶液配制：取猪胆汁（CJ250303）1.0 mL 置 10 mL 量瓶中，用体积分数为 1%的乙酸 - 甲醇溶液定容，摇匀即得。

2.2 全细胞催化水解工艺制备 HDCA

构建可表达胆盐水解酶（accession number：A0A805Z5R7）的基因工程菌。该酶可通过疏水口袋结合胆酸甾体骨架，同时极性区结合甘氨酸 / 牛磺酸侧链。当其与结合型 HDCA 结合后，N 端 Cys 的巯基可作为亲核点进攻酰胺键的羰基碳，使酰胺键极化、断裂，然后经水解脱酰，释放出游离胆酸。随后，所得的游离胆酸经镁盐沉淀和后续精制即可得熔点为 195 ℃的 HDCA。

基因工程菌构建：采用 pET-28a 为表达载体，将胆盐水解酶的基因序列插入 pET-28a 的限制性酶切位点 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ间，并加入 His-tag 纯化标签；将所得质粒转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆验证正确后，扩增并提取质粒，转化至表达菌株大肠埃希菌 BL21（DE3）中，采用 IPTG 诱导表达。（此部分内容由聊城大学生物催化与酶工程实验室完成。）

全细胞催化水解：取按文献[11]提取胆红素后的猪胆汁，加热至 70 ℃，用 20%硫酸调至 pH 5 ～ 7，降温至 35 ～ 50 ℃，加入上述基因工程全细胞菌液，保温反应 4 h。每隔 1 h 取样，按“**2.1**”项下色谱条件检测 HDCA 浓度。

成镁盐：根据 HDCA 的浓度计算硫酸镁的添加量，调节全细胞水解后的反应液 pH 值至 8.5 ～ 11.5，50 ～ 80 ℃保温搅拌反应 12 h，过滤，滤饼即为猪去氧胆酸镁盐湿品。

脱镁精制：取上述所得的猪去氧胆酸镁盐湿品，加入乙酸乙酯，加热至完全溶解后，用 20% 硫酸调节水层 pH 值为 3.5 ～ 6.5，加热至 80 ～ 85 ℃回流 30 ～ 90 min，70 ～ 80 ℃保温静置 1 h；取乙酸乙酯层，常压浓缩，回收乙酸乙酯，出现白色颗粒时停止浓缩，降温至 40 ℃，转至结晶罐，继续降温至 4 ℃，结晶 4 h。离心 (900×*g*) 20 min，所得 HDCA 湿品置热风循环烘箱中，于 80 ～ 85 ℃干燥 8 h，得熔点为 195 ℃的 HDCA 干品。

2.3 全细胞催化水解工艺参数优化

2.3.1 正交试验设计与结果

根据预试验结果，确定该步骤的考察因素为全细胞菌液用量 (*A*)、猪胆汁的 pH 值 (*B*) 和水解温度 (*C*)，以 HDCA 质量浓度为指标，按 $L_9(3^4)$ 正交试验表设计优化工艺，每个因素设计 3 个水平。具体试验设计和结果如表 1 所示。

称取提取胆红素后的猪胆汁 9 kg，平均分成 9 份，取光密度值为 120 的基因工程菌菌液，按“**2.2**”项下方法进行催化水解，并检测所得 HDCA 的质量浓度。结果如表 1 所示。

采用 Excel 2007 软件的方差分析模块进行计算。结果表明，各因素的主次关系为 *A*>*B*>*C*，其中因素 *A* 对 HDCA 质量浓度的影响极显著 (*P*<0.01)，因素 *B*、*C* 对 HDCA 质量浓度的影响均不显著 (*P*>0.05)。极差分析结果表明，优化方案为 $A_2B_3C_1$，即全细胞菌液用量为 1.0%，pH 值为 7，温度为 37 ℃。

2.3.2 验证试验

采用不同批次、不同投料量的 5 批猪胆汁，按上述优化工艺进行催化水解，按“**2.1**”项下方法检测水解液中的 HDCA 质量浓度，结果如表 2 所示。另取猪胆汁 1 kg，按文献 [8] 以传统化学法皂化 16 h，取样同法检测 HDCA 质量浓度，结果为 23.62 mg/mL。由表 2 可见，经优化后的工艺可适配不同批次、不同投料量的猪胆汁原料，实现结合型 HDCA 向游离型 HDCA 的高效转化。

表 1　全细胞催化水解工艺的正交试验结果

Tab.1　Orthogonal Experimental Results of the Whole-cell Hydrolysis Process

序号	*A*/%	*B*	*C*/℃	HDCA 质量浓度 /(mg·mL^{-1})
1	0.8	5	37	14.13
2	0.8	6	42	15.73
3	0.8	7	47	18.58
4	1.0	5	42	18.78
5	1.0	6	47	21.86
6	1.0	7	37	23.58
7	1.2	5	47	20.12
8	1.2	6	37	21.06
9	1.2	7	42	22.56

表 2　验证试验结果

Tab.2　Results of Verification Experiments

批号	猪胆汁投料量 /kg	水解液中的 HDCA 质量浓度 /(mg·mL^{-1})	成镁盐后滤液中的 HDCA 质量浓度 /(mg·mL^{-1})	提取率 /%
CJ250303	100	23.56	2.32	90.15
CJ250305	100	23.61	2.27	90.39
CJ250310	1 000	24.02	2.12	91.17
CJ250408	5 000	25.11	1.99	92.07
CJ250512	5 000	24.78	2.02	91.85

2.4 成镁盐工艺的优化

2.4.1 正交试验设计与结果

根据文献 [6-7] 及预试验结果，确定该步骤的考察因素为硫酸镁用量 (*D*)、反应温度 (*E*) 和水解液 pH 值 (*F*)，以 HDCA 的提取率为指标，以 $L_9(3^4)$ 正交表设计优化工艺，每个因素设计 3 个水平，具体试验设计和结果如表 3 所示。

称取全细胞催化水解后猪胆汁 (同一批次) 1 kg，取样，按“**2.1**”项下方法测得 HDCA 质量浓度为

表 3　猪去氧胆酸镁盐制备工艺正交试验结果

Tab.3　Orthogonal Test Results of the Preparation Process of Magnesium Hyodeoxycholate

序号	*D*/%	*E*/℃	*F*	HDCA 质量浓度 /(mg·mL^{-1})		提取率 /%
				水解液	滤液	
1	1.0	55	8.5	24.56	4.86	80.21
2	1.0	65	9.5	24.56	4.51	81.63
3	1.0	75	10.5	24.56	6.11	75.12
4	1.5	55	9.5	24.56	2.01	91.82
5	1.5	65	10.5	24.56	2.93	88.07
6	1.5	75	8.5	24.56	3.43	86.03
7	2.0	55	10.5	24.56	5.05	79.44
8	2.0	65	8.5	24.56	3.84	84.36
9	2.0	75	9.5	24.56	5.75	76.59

24.56 mg/mL，按表 3 中条件，以“**2.2**”项下方法制备猪去氧胆酸镁盐，取滤液检测残余 HDCA 的质量浓度，计算 HDCA 的提取率。

结果如表 3 所示。方差分析结果表明，各因素的主次关系为 *D*>*E*>*F*，其中因素 *D* 的影响具有显著意义（*P*<0.05），因素 *E*、*F* 对提取率的影响均不显著（*P*>0.05）。优化工艺为 $D_2E_1F_2$，即硫酸镁用量为 1.5%，温度为 55 ℃，pH 值为 9.5。

2.4.2 验证试验

用“**2.3.2**”项下 5 批全细胞催化水解产物，以“**2.4.1**”项下优化工艺制备猪去氧胆酸镁盐，并检测 HDCA 提取率。结果如表 2 所示。

2.5 精制工艺的优化

2.5.1 正交试验设计与结果

根据文献[12]及预试验结果，确定该步骤的考察因素为乙酸乙酯用量（*G*，猪去氧胆酸镁盐的质量倍数）、回流时间（*H*）、水层 pH 值（*I*），以 HDCA 的收率和熔点为考察指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计优化精制工艺，每个因素设计 3 个水平，具体试验设计和结果如表 4 所示。

取 CJ250512 批次制得的猪去氧胆酸镁盐 300 g，共 9 份，按照表 4 所示的条件进行脱镁精制。方差分析结果表明，各因素的主次关系为 *G*>*H*>*I*，其中因素 *G* 的影响具有统计学意义（*P*<0.05），因素 *H*、*I* 对收率的影响均不显著（*P*>0.05）。优化方案为 $G_2H_2I_3$，即 8 倍质量乙酸乙酯，回流 1 h，pH 值为 6.0。

将上述所得 HDCA 干品按 ChP 2025 年版中的方法检测熔点、比旋度、醇溶度和残渣。结果如表 4 所示，各试验所得的 HDCA 样品外观均澄清、无沉淀，除个别试验所得 HDCA 的熔点未达到 195 ℃以外，其他 3 个检查项均合格。

2.5.2 验证试验

最终的完整优化工艺流程如图 2 所示。取 5 批猪胆汁，按优化工艺进行验证试验。结果如表 5 所示，优化工艺放大至公斤级后仍可实现 95%以上的收率，说明该优化工艺稳定性良好。

3 讨论

3.1 全细胞菌液添加量

由于基因工程菌的高密度发酵方式，不能保证每批次水解反应中酶的活性完全相同。因此，要根据酶活计算不同批次全细胞的添加量。实际操作中可按菌液光密度值和投料量估算菌液的用量（以每吨猪胆汁中需加入理论光密度值为 120 的菌液 10 kg 为基准）。

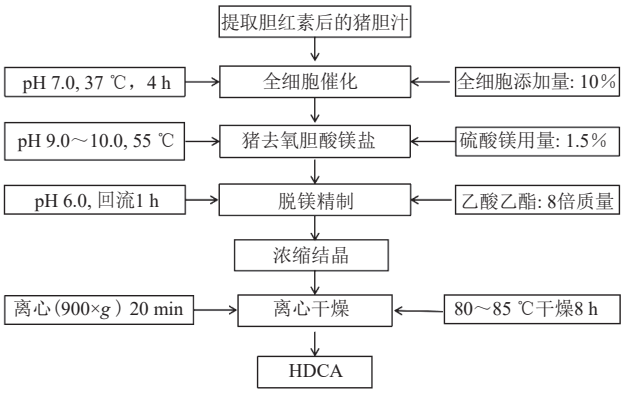


图 2 全细胞催化水解工艺生产 HDCA 的流程图

Fig.2 Flowchart of Whole-cell Catalytic Hydrolysis Process for HDCA Production

表 4 精制工艺正交试验结果

Tab.4 Results of Variance for the Refining Process

序号	*G*/ 倍数	*H*/min	*I*	理论 HDCA 质量 /g	实际 HDCA 质量 /g	收率 /%	熔点 /℃	比旋度 /(°)	残渣 /%
1	6	30	4	66.94	56.11	83.82	190.1 ～ 192.5	7.65	0.12
2	6	60	5	66.94	56.91	85.02	191.3 ～ 193.2	7.46	0.13
3	6	90	6	66.94	54.78	81.83	192.5 ～ 194.6	7.83	0.11
4	8	30	5	66.94	62.96	94.05	194.5 ～ 197.1	7.95	0.09
5	8	60	6	66.94	64.14	95.82	196.6 ～ 197.0	8.01	0.05
6	8	90	4	66.94	61.44	91.78	195.5 ～ 196.8	7.98	0.06
7	10	30	6	66.94	57.51	85.91	195.2 ～ 196.7	7.78	0.07
8	10	60	4	66.94	55.31	82.63	195.1 ～ 196.5	7.89	0.10
9	10	90	5	66.94	56.75	84.78	194.9 ～ 197.1	7.93	0.08

例如，在 CJ250512 批次的试验中，全细胞菌液的实际光密度值为 120，猪胆汁质量为 3 000 kg，添加量为$\frac{\text{理论光密度值}}{\text{实际光密度值}}$×3×10=30 kg，而 CJ250605 和 CJ250606 批次生产时菌液的实际光密度值为 150，则猪胆汁投料量 3 000 kg 时，其全细胞菌液添加量为$\frac{120}{150}$×30=24 kg。

3.2 硫酸镁的加料方式

硫酸镁会沉积在罐子底部，导致放料阀堵塞并影响猪去氧胆酸与镁盐的结合，因此不能将其直接加入水解液中。应先将硫酸镁加至 1.2 ～ 1.4 倍的水中，使其完全溶解后，从高位槽内流加，2 h 流加完毕后，继续搅拌 2 h，使 HDCA 与镁离子充分结合。

3.3 猪去氧胆酸镁盐的溶解操作

精制工艺中，猪去氧胆酸镁盐加入乙酸乙酯时溶解不充分，因此先需加热，再调 pH 值，以促进 HDCA 的溶解。

3.4 总结

本研究以提取胆红素后猪胆汁为原料，采用全细胞催化水解工艺制备 HDCA，并对工艺进行优化。最终的优化工艺如下：全细胞催化过程中，全细胞菌液用量为 1.0%，调节猪胆汁 pH 值为 7.0，于 37 ℃水解；硫酸镁用量为 1.5%，于 55 ℃、pH 9.0 ～ 10.0 条件下制备镁盐；采用 8 倍质量乙酸乙酯，于 pH 6.0 回流 1 h 精制，可得熔点为 195 ℃的 HDCA。该工艺稳定、可控，适合工业化生产。

表 5　不同批次 HDCA 的验证结果

Tab.5　Validation Results of Different Batches of HDCA

批次	猪胆汁量 /kg	全细胞菌液用量 /kg	水解液中 HDCA 质量浓度 /(mg·mL^{-1})	理论 HDCA 质量 /kg	实际 HDCA 质量 /kg	收率 /%	熔点 /℃
CJ250512	3 000	30	24.51	73.53	70.23	95.51	195.3 ～ 195.9
CJ250513	3 000	30	24.55	73.65	70.06	95.12	196.3 ～ 197.0
CJ250514	3 000	30	24.08	72.24	68.79	95.22	196.1 ～ 196.8
CJ250605	3 000	24	25.12	75.36	72.25	95.87	196.8 ～ 197.3
CJ250606	3 000	24	24.81	74.34	70.84	95.18	196.6 ～ 197.2

参考文献：

[1] 吴锦云，蔡凯伟，陈红英，等．HPLC-MS/MS 法同时测定清开灵口服液中 7 种成分的含量 [J]．中药新药与临床药理，2024, **35**(2)：257-262．

[2] 阿基业，王广基，徐　晨．猪去氧胆酸在制备抗抑郁药物中的应用：中国，115624555A [P]．2022-10-19．

[3] 周炜强．一种利用猪去氧胆酸制备熊去氧胆酸的方法：中国，113135973B [P]．2022-08-09．

[4] 张倚鸣，冉启军，程　铖，等．熊去氧胆酸有关物质的合成 [J]．中国医药工业杂志，2023, **54**(4)：533-539．

[5] 刘红兵，刘延凯，王博阳，等．一种马尾藻甾醇的合成方法：中国，113861258A [P]．2021-12-31．

[6] 林夏楠，彭秋生，鲍涵铸．一种从猪胆膏中提取猪去氧胆酸的方法：中国，114315948B [P]．2021-12-29．

[7] 张国明，苏俊英，李　琦，等．一种制备猪去氧胆酸提取物的方法：中国，115850362A [P]．2023-03-28．

[8] 范艳美，贾梦杰，刘培培，等．猪胆粉中猪去氧胆酸的提取、鉴定和含量测定 [J]．广州化工，2017, **45**(15)：148-150．

[9] 张　飞，赵静国，赵蒙浩．猪去氧胆酸与鹅去氧胆酸的提取纯化工艺 [J]．化学与生物工程，2013, **30**(8)：67-69．

[10] 卢方云．生物酶法从鸡胆汁中提制鹅去氧胆酸的工艺及应用研究 [D]．镇江：江苏大学硕士学位论文，2023．

[11] 吕红宝，李　凯，郭　庆．猪胆汁中胆红素提取工艺的研究 [J]．辽宁化工，2023, **52**(4)：506-508．

[12] 徐宾朋，郭　庆，赵　露，等．高含量猪去氧胆酸精制工艺的研究 [J]．辽宁化工，2020, **49**(8)：911-913．