

$^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照诱变筛选高降解胆固醇乳酸菌及益生功能评价

刘国琼^{1,2} 王曙阳^{1,2,3} 孙夕思^{2,3} 许富强^{2,3} 郭芳珠^{2,3} 肖国青^{2,3} 郭宝强⁴

¹ (甘肃农业大学食品科学与工程学院 兰州 730070)

² (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

³ (中国科学院大学生命科学学院 北京 101408)

⁴ (曼彻斯特城市大学 曼彻斯特 M15GD)

摘要 本研究采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照选育高降解胆固醇乳酸菌,评价体外降解胆固醇效应,评估其益生功能。通过优化KENJI筛选固体培养基,利用菌落直径大小对经 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照的罗伊氏乳杆菌JMR-01与干酪乳杆菌SN-2进行高降解胆固醇菌株筛选;通过测定菌株不同方式胆固醇降解率,探究突变菌株胆固醇降解率提高原因;评价菌株益生功能。结果表明:吸收剂量为300 Gy时,菌株JMR-01和SN-2突变率最高,该剂量更易获得突变菌株;筛选获得2株高降解胆固醇菌株JMR-01-1和SN-2-1,胆固醇降解率较原始菌株分别提升9.86%和11.54%,其主要是增强菌株对胆固醇吸收作用;突变菌株对胰脂肪酶、 α -葡萄糖苷酶和结肠癌细胞均有抑制作用,具有降血脂、血糖和辅助防治结肠癌潜力。该研究优化的筛选方法高效可行,提供了功能性益生菌产品优质菌株资源。

关键词 乳酸菌, $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照诱变, 高降解胆固醇菌株, 益生功能, 体外降解胆固醇效应

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0030

CSTR: 32195.14.j.JRRRP.1000-3436.2026-0030

引用该文:

刘国琼, 王曙阳, 孙夕思, 等. $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照诱变筛选高降解胆固醇乳酸菌及益生功能评价[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, XXXX, XX(X): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0030.

LIU Guoqiong, WANG Shuyang, SUN Xisi, *et al.* Breeding of high cholesterol-degrading lactic acid bacteria by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam irradiation and evaluation of their probiotic functions[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, XXXX, XX(X): XXXXXX. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2026-0030.



基金资助: 甘肃国家合作重点研发计划-国际合作领域 (25YFWA007) 和甘肃省国资委科技项目 (2025GZ040)

第一作者: 刘国琼, 女, 1999年出生, 2021年6月毕业于淮阴师范学院, 现为甘肃农业大学在读硕士研究生, 在中国科学院近代物理研究所做联合培养项目, 食品加工与安全专业, 研究方向是食品微生物, E-mail: lgq528012450@163.com

通信作者: 王曙阳, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: wangsy@impcas.ac.cn; 肖国青, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: xiaogq@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2026-04-09; 修回 2026-05-18

Supported by the Key R&D Program for International Cooperation of Gansu Province (International Cooperation Field) (25YFWA007), and Gansu SASAC Science and Technology Project (2025GZ040)

First author: LIU Guoqiong (female) was born in 1999, graduated from Huaiyin Normal University in June 2021. Currently, she is a master candidate at Gansu Agricultural University and conducts a joint training program at the Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences. Her major is food processing and safety, and her research focuses on food microbiology. E-mail: lgq528012450@163.com

Corresponding author: WANG Shuyang, doctoral degree, professor, doctoral supervisor, E-mail: wangsy@impcas.ac.cn; XIAO Guoqing, doctoral degree, professor, doctoral supervisor, E-mail: xiaogq@impcas.ac.cn

Received 09 April 2026; accepted 18 May 2026

Breeding of high cholesterol-degrading lactic acid bacteria by $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam irradiation and evaluation of their probiotic functions

LIU Guoqiong^{1,2} WANG Shuyang^{1,2,3} SUN Xisi^{2,3} XU Fuqiang^{2,3}
GUO Fangzhu^{2,3} XIAO Guoqing^{2,3} GUO Baoqiang⁴

¹(College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

²(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730070, China)

³(College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China)

⁴(Department of Life Sciences, Faculty of Science and Engineering, Manchester Metropolitan University, Manchester M15GD, UK)

ABSTRACT High cholesterol-degrading lactic acid bacteria were bred via $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam irradiation, and their *in vitro* cholesterol-degrading effects and probiotic functions were evaluated. By optimizing the KENJI solid screening medium, high cholesterol-degrading strains of $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beam-irradiated *Lactobacillus reuteri* JMR-01 and *Lactobacillus casei* SN-2 were screened based on colony diameter. The cholesterol degradation rates of the strains through different approaches were determined to explore the reasons for the improved cholesterol degradation efficiency of the mutant strains, and the probiotic functions of the strains were evaluated. The results showed that the mutation rates of strains JMR-01 and SN-2 were the highest at an irradiation dose of 300 Gy, and this irradiation dose was more favorable for obtaining mutant strains. Two high cholesterol-degrading strains, JMR-01-1 and SN-2-1, were screened, with their cholesterol degradation rates increased by 9.86% and 11.54% respectively compared with the original strains, which was mainly attributed to the enhanced cholesterol absorption of the strains. The mutant strains showed inhibitory effects on pancreatic lipase, α -glucosidase and colon cancer cells, indicating the potential to lower blood lipids and blood glucose and assist in the prevention and treatment of colon cancer. The optimized screening method in this study is efficient and feasible, and provides high-quality strain resources for functional probiotic products. In this study, high cholesterol-degrading lactic acid bacteria were obtained via $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion beam mutagenesis, and their *in vitro* cholesterol degradation capacity and probiotic characteristics were further assessed. By optimizing Kenji solid screening medium, mutant strains of irradiated *Lactobacillus reuteri* JMR-01 and *Lactobacillus casei* SN-2 were screened out according to colony diameter. Cholesterol degradation efficiencies under different conditions were determined to reveal the intrinsic mechanism for the enhanced degradation performance of mutants, and their probiotic potentials were comprehensively evaluated. The results demonstrated that the irradiation dose of 300 Gy yielded the highest mutation frequency for both strains, which was the optimal condition for mutant acquisition. Two excellent mutant strains, JMR-01-1 and SN-2-1, were successfully isolated. Compared with wild-type strains, their cholesterol degradation rates increased by 9.86% and 11.54%, respectively, which was primarily attributed to the improved cholesterol adsorption capability. Moreover, these mutants exerted obvious inhibitory effects on pancreatic lipase, α -glucosidase and colon cancer cells, suggesting their promising applications in lipid regulation, hypoglycemic regulation and auxiliary intervention against colon cancer. In conclusion, this optimized screening protocol is efficient and reliable, which lays a solid foundation for screening superior strains and facilitates the research and development of functional probiotic products.

KEYWORDS *Lactobacillus*, $^{12}\text{C}^{6+}$ heavy ion beam irradiation mutagenesis, High-efficiency cholesterol-degrading *Lactobacillus* strain, Probiotic function, *In vitro* cholesterol degrading effect

CLC TL99

高糖高脂饮食作为现代生活中常见的膳食模式，长期摄入可对机体胆固醇代谢产生显著负面影响，进而成为多种慢性疾病的重要诱因。胆固

醇代谢紊乱不仅与胰岛素抵抗、高血压、血脂异常等代谢综合征密切相关，还会显著提升心血管疾病、糖尿病及非酒精性脂肪肝的发病风险^[1]。

此外,研究证实高胆固醇水平可促进结肠癌细胞的增殖、侵袭与迁移,成为结直肠癌发生的潜在危险因素^[2]。因此,寻求安全有效的降低胆固醇方法,对于慢性病防控具有重要意义。近年来,益生菌尤其是乳酸菌在调节脂质代谢方面的作用备受关注。乳酸菌通过对胆固醇的吸收和共沉淀作用,促进肠道胆固醇排出,降低机体胆固醇水平^[3]。研究发现乳酸菌通过降低肠道与结肠癌发生发展相关特征菌群及代谢产物,预防和抑制肿瘤进程。相较于传统药物干预(如他汀类、依折麦布)^[4-5],长期摄入乳酸菌未见明显的肝肾毒性或肌肉损伤风险,具有更高的安全性。因而益生菌的干预在轻中度高脂血症患者、药物不耐受人群的血脂管理及结肠癌的预防展现出良好的应用潜力。

然而,目前报道的降解胆固醇乳酸菌多从传统乳制品中分离,存在来源单一、胆固醇降解率低的问题。目前降解胆固醇乳酸菌的筛选采用MRS-CHOL液体培养法进行胆固醇降解率的测定。该方法缺少筛选压力、周期长、工作量大,且菌株胆固醇降解率偏低^[6-7]。因此,建立快速、高效的高降解胆固醇乳酸菌筛选方法具有重要意义。诱变育种是获得高性能菌株的有效途径。韩晶晶等^[8]以高能脉冲电子束作为诱变手段筛选得到1株稳定的高产酒精酵母YF1,其酒精产量提高了58.23%。茅文俊等^[9]通过266 nm激光诱变筛选得到1株高葡萄糖转化率呼吸缺陷型酵母JB7,其葡萄糖酒精转化率提高了4.64%。邵娜等^[10]通过2轮紫外线和1轮 γ 射线诱变筛选得到1株S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽联产发酵菌株SUGS-01,其S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽产量分别提高了131.4%和26.0%。王连峰等^[11]以 N^+ 离子束诱变筛选得到2株阿魏菇多糖高产菌株PFPH-1和PFPH-2,其菌丝产糖量分别提高了46.55%和75.14%。X射线、 γ 射线及紫外线等传统物理诱变存在突变率低,突变谱窄等不足。而重离子束因其高传能线密度(LET)的物理特性,在穿过细胞时可沿径迹沉积更高的能量密度,诱发更多更复杂的DNA损伤,修复产生更多样化的突变。因此,重离子束诱变具有突变效率高、突变谱广、遗传稳定性好等优势,且无化学诱变剂残留问题,契合食品用益生菌要求,为选育高降解胆固醇乳酸菌提供了高效可靠的方法^[12-15]。此外,降低机体胆固醇水平对血脂、血糖的管理以及改善结肠癌发生发展均有重

要作用,但对于乳酸菌降解胆固醇能力的提升对其降低血脂、血糖能力及抑制结肠癌细胞增殖、产生的影响还未见报道。

因此,本研究采用 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束对乳酸菌JMR-01和SN-2进行辐照诱变,通过优化KENJI固体培养基组成及胆固醇溶解方式,利用菌落直径大小进行高通量降解胆固醇乳酸菌初筛,结合硫酸铁铵法复筛,筛选高降解胆固醇突变菌株,评价体外降解胆固醇效应,评估高降解胆固醇突变菌株在降血脂、血糖以及抑制结肠癌方面的潜在能力,为开发具有综合代谢调节功能的益生菌制剂提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 菌株

罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*, JMR-01)分离自本实验室益生菌治疗肿瘤小鼠肠道粪便样本中,体外结肠癌细胞抑制率为28.44%,动物实验表明其对结肠癌有预防潜力(NCBI登录号:MT362007)^[16];干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, SN-2)由传统发酵酸奶制品中分离,本实验室保存。

1.2 主要仪器

DHP-9082型电热恒温箱,上海一恒科学仪器有限公司;SW-CJ-1C型双人单面净化工作台,苏州净化设备有限公司;756PC型-紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;BS224S电子天平、TE101-L天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;LDZX-30KB立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;旋涡混合器,上海康华生化仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 $^{12}\text{C}^{6+}$ 辐照诱变及致死率测定

取37℃恒温培养24 h的JMR-01、SN-2菌株新鲜斜面,加入10 mL无菌生理盐水,振荡制备菌悬液。取2 mL菌悬液置于35 mm辐照皿中,用封口膜封口。重离子辐照设0 Gy、40 Gy、60 Gy、120 Gy、180 Gy、240 Gy、300 Gy和400 Gy 8个吸收剂量,每个吸收剂量设3个平行,总共24个样品。辐照实验在兰州重离子加速器国家重点实验室的生物浅层TR4辐照终端完成,辐照离子种

类为 $^{12}\text{C}^{6+}$ ，能量 80 MeV/u，剂量率为 100 Gy/min。辐照处理后的样品立即涂板和甘油低温保存，参照王雨辰^[12]的方法测定辐照菌株致死率。

1.3.2 高通量筛选高降解胆固醇乳酸菌方法建立

KENJI 固体筛选培养基优化。由于在 KENJI 固体筛选培养基制备过程中出现胆固醇片状沉淀，胆固醇溶解度影响乳酸菌生长。本研究探究不同溶解方式对胆固醇溶解度的影响，方案如下：（1）超声乳化组（Ultrasonic emulsification, UE 组）采用超声乳化法，将 1.0 g 胆固醇置于 100 mL 无菌水中，超声（600 W）处理 20 min；（2）DMSO 组采用 DMSO 溶解法，将 1.0 g 胆固醇溶解于 10 mL DMSO；（3）无水乙醇（Anhydrous ethanol, AE 组）采用无水乙醇溶解法，将 1.0 g 胆固醇溶解于 5 mL 无水乙醇；（4）CK 组采用水溶解法，将 1.0 g 胆固醇溶解于 100 mL 水。上述各组胆固醇溶液中均加入牛胆盐 2.0 g， NH_4NO_3 1.0 g， MgSO_4 0.25 g， NaH_2PO_4 0.25 g，酵母粉 2.0 g， FeSO_4 5 mg，吐温-80 2 mL，补充蒸馏水定容至 1 000 mL^[17]。并于 115 °C，灭菌 30 min。利用硫酸铁铵法^[18]测不同溶解方案对培养基中胆固醇溶解度的影响。

酵母粉为乳酸菌生长提供碳源、氮源及生长因子，可促进其增殖代谢。由于 KENJI 固体筛选培养基中乳酸菌菌落偏小，影响直径判定准确性及筛选效率，本研究优化培养基中酵母粉浓度。配制酵母粉浓度为 5 g/L、2.5 g/L、2.0 g/L、0.2 g/L 的系列 KENJI 固体培养基，其余组分不变，115 °C 灭菌 30 min。制备 10^{-6} CFU/mL JMR-01 菌悬液，取 100 μL 涂布于各浓度培养基，37 °C 恒温培养 3~4 d 后测菌落直径，每组 3 个平行。

辐照诱变乳酸菌直径与其胆固醇降解率关系。选用辐照后的菌株菌悬液，进行菌株直径与其胆固醇降解能力相关性研究。将辐照后的 JMR-01 菌悬液稀释至 10^{-6} CFU/mL 后，取 100 μL 均匀涂布于 KENJI 固体筛选培养基，37 °C 培养 3~4 d，待单菌落形成，挑取不同直径单菌落，接种于 MRS 液体培养基，37 °C 培养 24 h，制备发酵液。将上述发酵液按 1% 接种于 MRS-CHOL 液体培养基^[18]，37 °C 培养 24 h。培养结束后将菌液混匀，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，以未接菌 MRS-CHOL 培养基为对照，采用硫酸铁铵法测菌株胆固醇降解率。以菌落直径为横坐标，胆固醇降解率为纵坐标，进行线性回归分析。

1.3.3 高降解胆固醇乳酸菌的筛选

将各吸收剂量下的菌悬液稀释至 10^{-6} CFU/mL，取 100 μL 均匀涂布于 KENJI 固体筛选培养基，于 37 °C 倒置培养 3~4 d 并计数。以受照菌株菌落直径高于原始菌株菌落直径平均值 20% 记为正突变，低于原始菌株菌落直径平均值 20% 记为负突变。分别按式（1）和（2）计算正突变率与负突变率。确定辐照菌株的最优突变剂量。

$$\text{正突变率} = \frac{N_{+20\%}}{N_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{负突变率} = \frac{N_{-20\%}}{N_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中： $N_{+20\%}$ 为辐照菌悬液菌落直径比未辐照菌悬液菌株菌落直径平均值高 20% 的菌落数； $N_{-20\%}$ 为辐照菌悬液菌落直径比未辐照菌悬液菌株菌落直径平均值低 20% 的菌落数； N_0 为辐照菌悬液总菌落数。

利用辐照诱变乳酸菌直径与其胆固醇降解率之间的关系，采用 KENJI 固体筛选培养基对最优突变剂量的辐照乳酸菌进行初筛，得到菌落直径较原始菌株提高超 20% 的菌株。将原始菌株与各突变菌株分别接种于 MRS 液体培养基中培养 24 h 后，按 1% 接种量转接至 MRS-CHOL 培养基中继续培养 24 h，采用硫酸铁铵法测菌株胆固醇降解率进行复筛，得到胆固醇降解率较原始菌株显著增加的突变菌株。将最终得到的突变菌株连续传代 6 次，评估菌株降解胆固醇能力的遗传稳定性^[12]。

1.3.4 KENJI 筛选法筛选高降解胆固醇乳酸菌的效应评价

对原始菌株、高降解胆固醇突变菌株进行效应评价。分别将原始菌株、高降解胆固醇突变菌株接种于 MRS-CHOL 液体培养液，37 °C 培养 24 h，取 2 mL 发酵液，利用硫酸铁铵法测发酵液总胆固醇降解率（Total cholesterol degradation rate, TCDR）；取 2 mL 发酵液，8 000 r/min 离心 10 min 后弃上清，在菌体沉淀中加入 4 mL 磷酸钠缓冲液重悬，8 000 r/min 离心 10 min，取 2 mL 上清液，测共沉淀作用胆固醇降解率（Cholesterol degradation rate by co-precipitation, CDR-CP）；弃去剩余上清液，向沉淀中加入 4 mL 磷酸钠缓冲液及 100 μL 50 mg/mL 溶菌酶，冰浴条件下使用超声波细胞破碎仪以 200 W 功率处理 30 min（工作 5 s，间隔 5 s），取 2 mL 破碎液 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 2 mL 测菌株吸收作用胆固醇降

解率 (Cholesterol degradation rate by adsorption, CDR-A) [19-20]。以未接种菌株的MRS-CHOL液体培养液为对照组。计算公式分别如式 (3)、(4) 和 (5)。

$$\text{胆固醇总降解率} = \frac{c_{T0} - c_{TS}}{c_{T0}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{共沉淀作用胆固醇降解率} = \frac{c_{TX}}{c_{T0}} \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{吸收作用胆固醇降解率} = \frac{c_{TP}}{c_{T0}} \times 100\% \quad (5)$$

式中： c_{T0} 为对照组胆固醇含量； c_{TS} 为实验组胆固醇含量； c_{TX} 为细胞洗涤液中胆固醇含量； c_{TP} 为细胞破碎液中胆固醇含量。

1.3.5 高降解胆固醇菌株的益生功能

高降解胆固醇菌株抑制胰脂肪酶活力测定。将各高降解胆固醇突变菌株接种于MRS液体培养液培养24 h，将发酵液在4℃，8 000 r/min离心10 min，用0.22 μm滤膜过滤制备菌株发酵液；收集菌体加入无菌水洗涤菌体3次后，用无菌水重悬，调整OD 600值至2.00±0.05，得到菌悬液，保存于4℃。取出一部分菌悬液置于冰水浴中超声破碎（5 s/次，间隔5 s，持续1 h），4℃，10 000 r/min离心10 min收集上清液得到胞内提取物，保存于4℃。根据孙晓琛等[21]的方法对菌株抑制胰脂肪酶活性进行测定。

高降解胆固醇菌株抑制α-葡萄糖苷酶活力测定。将制备的菌株发酵液及胞内提取物参考张会[22]和朱萌茜[23]的方法对菌株抑制α-葡萄糖苷酶活性进行测定。

高降解胆固醇菌株抑制CT26细胞增殖实验。采用CCK-8法检测高降解胆固醇乳酸菌抑制结肠癌CT26细胞增殖的研究。用胰酶消化CT26细胞，调整其浓度为 10^6 个/mL，以每孔100 μL的量移入96孔细胞培养板中，置于5% CO₂，37℃细胞培养箱中培养过夜，待细胞贴壁后备用。将菌株细胞用不含双抗的培养基稀释至合适浓度，调整菌体细胞与癌细胞的比 (CFU: cells) 分别为1:1、1:50、1:100，以每孔100 μL的量添加到肿瘤细胞贴壁的96孔板细胞培养板中，分别检测菌株对结肠癌CT26细胞增殖的抑制作用，每个浓度设4个平行。以不添加菌株的细胞为对照。分别于5% CO₂，37℃共培养24 h，每孔加入100 μL的CCK-8试剂，置于培养箱中继续孵育2 h。450 nm处测OD值，计算肿瘤细胞抑制率[24]。

1.3.6 数据处理

实验数据采用SPSS 23.0进行统计分析，并用Origin 8.0进行图表处理，结果用平均值±标准误差表示，以 $p < 0.05$ 表示差异显著， $p < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 重离子辐照剂量对菌株致死率的影响

参照王雨辰[12]统计不同吸收剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束对菌株JMR-01和SN-2致死率的影响，作菌株致死率曲线。结果如图1，两株乳酸菌的死亡率随吸收剂量增大均呈上升趋势。吸收剂量300 Gy之前，随着吸收剂量的增加两株菌株的死亡率增长迅速；当吸收剂量达到300 Gy时，两株菌株的死亡率增长趋于平缓。在300 Gy时菌株JMR-01与SN-2的致死率也分别达到较大值85.70%和93.90%。研究表明， $^{12}\text{C}^{6+}$ 束具有高传能线密度 (Linear energy transfer, LET)，可在生物介质中诱发密集电离与能量沉积，引起DNA断裂并诱导产生染色体易位等错误修复，进而促进突变体生成，在高剂量重离子束下，DNA损伤累计超过细胞修复能力阈值，导致不可逆的细胞死亡，菌株致死率逐渐提高[12, 25]。

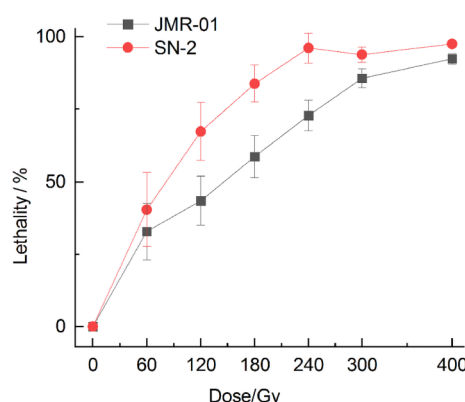


图1 重离子辐照JMR-01和SN-2菌株致死率曲线
Fig.1 Lethal curves of mutagenesis induced by heavy ion irradiation

2.2 高通量筛选高降解胆固醇乳酸菌方法优化

采用硫酸铁铵法测不同溶解方式对KENJI固体筛选培养基中胆固醇溶解度的影响。结果显示 (图2 (a))，UE组胆固醇含量最高，为0.79 mg/mL，与CK组 (0.29 mg/mL) 相比提高了172.41%，差异极显著 ($p < 0.01$)。分析表明，超声

乳化处理通过空化效应与机械振动作用,有效打破胆固醇的疏水相互作用,降低其团聚程度,可有效促进胆固醇在培养基中的分散与溶解,是KENJI固体筛选培养基中胆固醇的最优溶解方式^[26-27]。

以胆固醇作为主要碳源筛选高降解胆固醇菌株时培养基中菌落形态偏小,因此对培养基中酵母粉进行浓度梯度优化探究其对菌落直径的影响。结果显示(图2(b)),菌落直径随酵母粉浓度升高呈现“先增大后减小”的变化趋势。当酵母粉浓度为2.0 g/L时,菌落生长状态最优,菌落直径达1.21 mm,与CK组(0.88 mm)相比提高了

37.50%,差异显著($p<0.05$);剩余各组菌落直径与CK组相比均未产生显著差异。分析可知,酵母粉作为氮源、维生素及生长因子的重要来源,浓度过低会因营养不足导致菌落偏小,过高则可能引发培养基渗透压失衡或营养比例失调,抑制菌株生长^[28]。

通过检测25株JMR-01突变株菌落直径与胆固醇降解率,线性回归分析显示(图2(c)),KENJI固体筛选培养基中菌株菌落直径与其胆固醇降解率呈显著正相关(回归方程: $y=24.308x+5.9954$, $R^2=0.975$),可通过菌落直径实现高降解胆固醇菌株高效初筛。

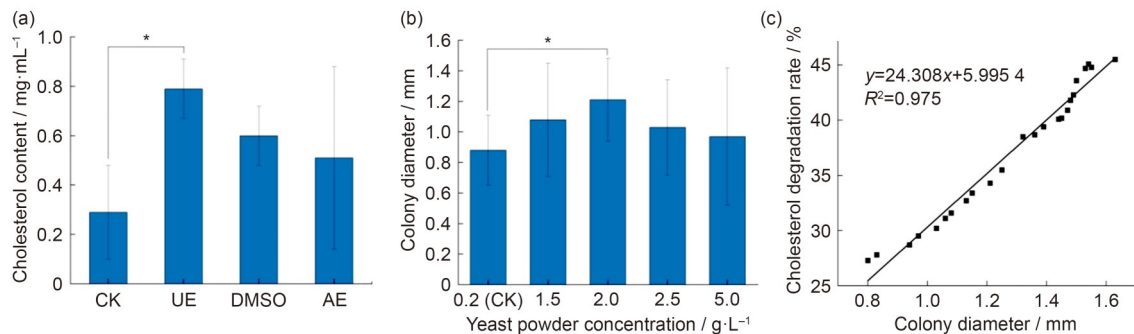


图2 高通量筛选高降解胆固醇乳酸菌方法建立:(a)不同溶解方式改良培养基中胆固醇溶解度;(b)不同酵母粉浓度改良培养基菌落直径;(c)菌落直径与胆固醇降解能力间的关系

Fig.2 High-throughput screening of cholesterol-degrading LAB: (a) solubility of cholesterol in modified media under different dissolution protocols; (b) colony diameter in modified media under different yeast powder concentrations; (c) correlation of colony diameter with cholesterol degradation

2.3 高降解胆固醇乳酸菌的筛选

2.3.1 高降解胆固醇乳酸菌最佳筛选剂量确定

为提高高降解胆固醇菌株的辐照诱变筛选效率,统计不同剂量¹²C⁶⁺束辐照菌株JMR-01和SN-2的正、负突变率,确定最佳筛选剂量。如图3(a)所示,随吸收剂量增加,两菌株的正、负突变率均逐渐上升,并在300 Gy时达到最高。其中,JMR-01的最高正、负突变率分别为15.31%和18.45%,SN-2分别为11.21%和10.88%。

2.3.2 高降解胆固醇突变株的初筛与复筛

经300 Gy ¹²C⁶⁺束辐照诱变后,利用菌落直径进行高降解胆固醇菌株初筛,从400多个突变体中筛选出14株JMR-01和12株SN-2突变菌株,其菌落直径均较原始菌株(JMR-01为1.21 mm,SN-2为1.18 mm)提高20%以上。以胆固醇降解率为评价指标,利用硫酸铁铵法对初筛获得的26株突变菌株进行复筛。结果如图3(b)所示。JMR-01的14株突变株中2株降解率显著提升,其中JMR-01-1

最优,菌株直径为1.73 mm,较原始菌株直径提高42.98%,胆固醇降解率达56.36%,较原始菌株提高9.86%($p<0.05$);SN-2的12株突变株中2株降解率显著升高,SN-2-1表现最佳,菌株直径为1.71 mm,较原始菌株直径提高44.92%,胆固醇降解率为55.28%,较原始菌株提升11.54%($p<0.01$)。魏玲玲等^[13]采用紫外诱变选育高降解胆固醇嗜酸乳杆菌,提升幅度达8%,最高胆固醇降解率仅为21.5%。¹²C⁶⁺束的LET特性可造成DNA双链断裂,更易诱导极限突变,突变谱高于紫外诱变,体现了¹²C⁶⁺束诱变在菌株性能改良中的技术优势。

2.3.3 高胆固醇降解能力菌株遗传稳定性测定

菌种的遗传稳定性是影响菌株开发应用的关键因素。对筛选获得的4株高降解胆固醇能力菌株(JMR-01-1、JMR-01-2、SN-2-1、SN-2-9)进行遗传稳定性研究。结果见图3C。传至第6代时,4株突变菌株的胆固醇降解率与初始代相比均无显著差异($p>0.05$)。表明这些突变株自发突变率低,

未因传代出现衰退现象，具备稳定的胆固醇降解遗传特性，具备进一步开发应用的潜力。

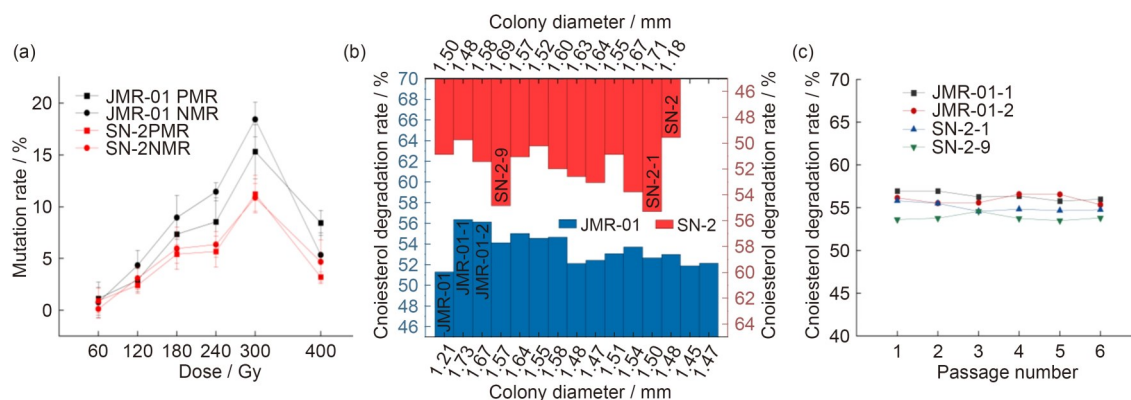


图3 高降解胆固醇菌株的筛选：(a)辐照菌株正负突变率；(b)高降解胆固醇菌株筛选结果；(c)突变菌株遗传稳定性
Fig.3 Screening for bacterial strains with high cholesterol-degrading: (a) positive and negative mutation rates in irradiated strains; (b) results of screening for high cholesterol-degrading strains; (c) genetic stability of mutant strains

2.4 KENJI 筛选法筛选高降解胆固醇乳酸菌的效应评价

对高降胆固醇突变株进行效应评价，本研究对比4株高产突变株（JMR-01-1、JMR-01-2、SN-2-1、SN-2-9）与其原始菌株（JMR-01、SN-2）的总胆固醇降解率、共沉淀作用与吸收作用对胆固醇降解效果的贡献差异。其中，胆固醇总降解率包含共沉淀、吸收及其他作用（氧化或代谢转化等）的胆固醇降解率，其中共沉淀、吸收作用胆固醇降解率在总胆固醇降解率中占比达60%~85%^[29]。结果见图4，突变株总胆固醇降解率均较原始菌株实现显著提升。进一步分析发现，突变株JMR-01-1、JMR-01-2的吸收作用胆固醇降解率较原始菌株JMR-01分别提高16.60%、18.61%（ $p < 0.01$ ）；突变株SN-2-1、SN-2-9的吸收作用胆固醇降解率较原始菌株SN-2分别提高20.26%、15.05%（ $p < 0.01$ ）。而共沉淀作用胆固醇降解率在突变株与原始株间无显著差异。这一结果证实：基于菌落大小筛选高降解胆固醇菌株的方法，有效筛选出以吸收胆固醇为主的菌株，所获突变株胆固醇降解能力提升主要源于菌体细胞对胆固醇的吸收作用。本研究优化的KENJI筛选培养基以胆固醇作为主要碳源，当乳酸菌对胆固醇吸收利用能力越强其生长状况越好（菌落直径越大）。

Miremadi等^[30]研究发现，益生菌吸收作用降解胆固醇能力与细胞膜脂肪酸组成密切相关。乳酸菌可通过调整细胞膜结构实现对胆固醇的高效固定，胆固醇分子嵌入细胞膜磷脂双分子层中，增加了乳酸菌对胆固醇的吸收作用。因此，通过

调控乳酸菌细胞膜中脂肪酸比例，改善膜流动性，增强乳酸菌对胆固醇的吸收能力。诱变选育可能引起高降解胆固醇菌株的细胞膜组成、膜流动性及膜通透性等多方面变化，进而促进了乳酸菌对胆固醇的吸收能力。此外，相较于菌体与胆固醇共沉淀作用易受体外培养条件（如胆盐浓度）或体内肠道微环境波动的影响，菌体对胆固醇吸收作用依赖菌株自身的结构与代谢能力，稳定性更强。从应用角度来看，这类以吸收作用为核心的菌株具有更高的开发价值。

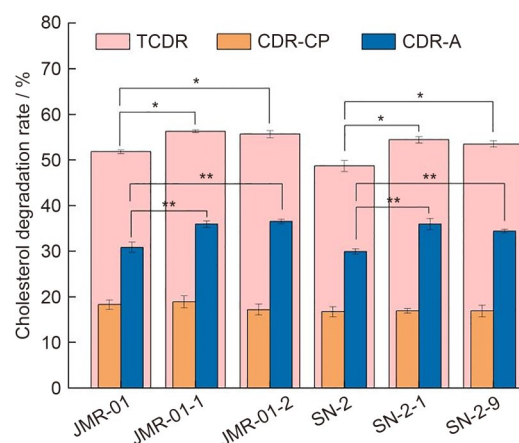


图4 突变菌株各作用降解胆固醇能力(彩色见网络版)
Fig.4 Cholesterol degradation by various modes of action in mutant strains (color online)

2.5 高降解胆固醇菌株的益生功能

2.5.1 高降解胆固醇菌株的胰脂肪酶抑制率

为评价高降解胆固醇菌株的降血脂潜力，开展了突变菌株提取物与发酵上清液对胰脂肪酶活

性抑制研究。结果如图5(a),所有菌株发酵上清液和菌株提取物均对胰脂肪酶活性有抑制作用,但抑制率均显著低于药物对照组(CK),且各菌株提取物对胰脂肪酶活性的抑制作用均高于其发酵上清液的抑制作用。其中,菌株SN-2-9提取物对胰脂肪酶的抑制能力最强,为65.59%。显著高于文献报道的植物乳杆菌BC17胞内提取物(34.92%)^[22]与鼠李糖乳杆菌hsryfm 1301(37.25%)^[31]。因此,这些菌株具备通过抑制脂肪吸收实现降血脂潜力。

2.5.2 高降解胆固醇菌株的 α -葡萄糖苷酶抑制率

为评价高降解胆固醇菌株的降血糖潜力,开展了突变菌株提取物与发酵上清液对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制研究。结果见图5(b),所有菌株均有抑制作用,各菌株提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用均高于其发酵上清液的抑制作用。其中,菌株SN-2-9提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制能力最强,为76.31%,与药物对照组(CK)相比抑制率提高了6.13%,差异显著($p<0.05$)。该突变菌株对 α -葡萄糖苷酶抑制率显著高于张会^[23]筛选出的乳酸片球菌GC215(56.70%)和朱荫茜^[24]筛选出的发酵乳杆菌LF3.2(38.62%)。因此,筛选菌株均展现出通过延缓碳水化合物吸收降低血糖潜力。

2.5.3 高降解胆固醇菌株对CT26细胞增殖的影响

菌株JMR-01分离自肿瘤治疗小鼠粪便,具备抑制肿瘤细胞增殖作用。因此采用CCK-8法研究高降解胆固醇突变菌株对CT26细胞增殖抑制作用。由图5(c)可知,所有菌株在不同浓度下对肿瘤细胞CT26均表现出抑制作用。JMR-01系列菌株对肿瘤细胞抑制作用随菌株浓度的升高增强。与原始菌株JMR-01(19.01%)相比,突变菌株JMR-01-2在低浓度(CT26:JMR-01-2=1:1)条件下,对肿瘤细胞的抑制作用提高了50.24%($p<0.05$)。SN-2系列菌株对肿瘤细胞的抑制作用与浓度不存在相关性,突变菌株SN-2-9在不同浓度均对肿瘤细胞均有强抑制作用。这两种菌株可能通过不同途径发挥抗肿瘤作用。其中,JMR-01系列菌株对肿瘤细胞的抑制作用与浓度相关,表明其作用可能是通过消耗肿瘤微环境中的胆固醇,影响肿瘤细胞的膜完整性,干扰肿瘤细胞增殖,提高了抑制率^[32];而SN-2系列菌株对肿瘤细胞的抑制与浓度无关,可能是该系列菌株能分泌一种代谢产物能够高效抑制肿瘤细胞。Bai等^[24]研究表明,益生菌对结直肠癌细胞的抑制作用主要源于益生菌及其代谢产物直接抑制肿瘤细胞的增殖,发挥抗肿瘤作用。因此,高降解胆固醇菌株在治疗结肠癌方面具有一定的潜力。

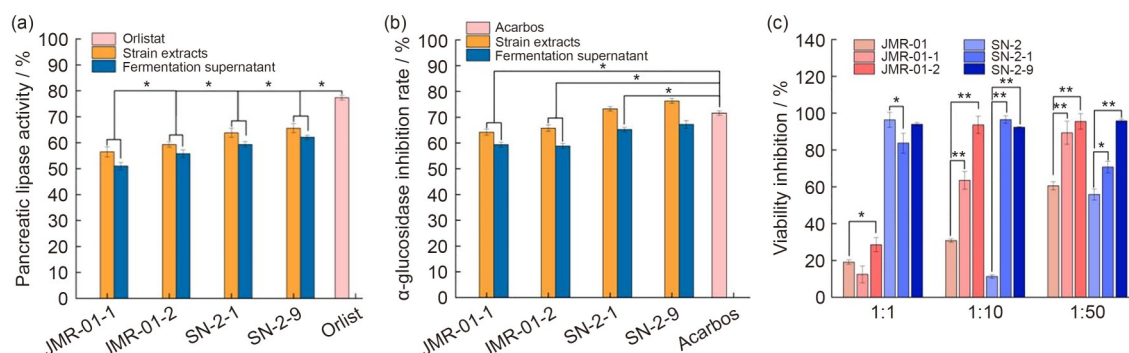


图5 高降解胆固醇菌株的益生功能(彩色见网络版):(a)高降解胆固醇菌株的胰脂肪酶抑制率;(b)高降解胆固醇菌株的 α -葡萄糖苷酶抑制率;(c)高降解胆固醇菌株对CT26细胞增殖的影响

Fig.5 Probiotic potential of cholesterol-degrading bacterial strains (color online): (a) inhibition rate of pancreatic lipase by cholesterol-degrading bacterial strains; (b) inhibition rate of α -glucosidase by cholesterol-degrading bacterial strains; (c) effects of high cholesterol-degrading strains on the proliferation of CT26 cells

3 结论

本研究通过优化KENJI筛选培养基中的胆固醇溶解度以及酵母粉浓度,以菌落直径为初筛指标进行降解胆固醇乳酸菌筛选,用于快速大量筛选高降解胆固醇突变菌株。应用该方法对经

300 Gy剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐照的罗伊氏乳杆菌JMR-01和干酪乳杆菌SN-2进行筛选,成功获得4株遗传稳定性良好的高降解胆固醇突变株:JMR-01-1、JMR-01-2、SN-2-1和SN-2-9。其中,JMR-01-1和SN-2-1的总胆固醇降解率较原始菌株分别显著提高9.86%和11.54%。结果表明,突变株胆固醇降

解能力的提升主要源于菌体对胆固醇吸收能力的增强。具体而言，JMR-01 系列突变株对胆固醇吸收作用降解率提高了 16.60%~18.61%，SN-2 系列提高了 15.05%~20.26%，进一步证实了该方法对筛选以吸收作用为主导的高降解胆固醇菌株的有效性。此外，所有筛选菌株均有很好的降血脂、血糖和辅助防治结肠癌潜力。其中，突变菌株 SN-2-9 的胰脂肪酶抑制率 65.59%， α -葡萄糖苷酶抑制率 76.31%，且其对肿瘤细胞 CT26 的抑制能力最稳定。综上，本研究利用菌落大小筛选降解胆固醇菌株的方法可为高降解胆固醇乳酸菌的选育提供可靠的技术支持，所获突变株在功能性食品与微生态制剂开发中具有良好应用潜力。

作者贡献声明 刘国琼负责初稿写作、论文构思、数据分析；王曙阳和肖国青负责论文构思、初稿审核与编辑；许富强负责辅助论文构思；孙夕思负责辅助初稿写作和数据分析；郭芳珠和郭宝强负责辅助数据分析。所有作者均已阅读并同意最终文本。

参考文献

- 周青青, 蒋丰岭, 王家妮, 等. 不同饮食摄入对小鼠糖脂代谢、肠道菌群的影响[J]. 食品研究与开发, 2021, **42**(10): 16-23.
ZHOU Qingqing, JIANG Fengling, WANG Jiani, *et al.* Effects of different dietary ingestions on glucose and lipid metabolism, intestinal microbiota in mice[J]. Food Research and Development, 2021, **42**(10): 16-23.
- 陈心, 伍龙, 张一桥, 等. 胆固醇对人结肠癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响及机制探讨[J]. 山东医药, 2017, **57**(18): 1-4.
CHEN Xin, WU Long, ZHANG Yiqiao, *et al.* Effect of cholesterol on proliferation, invasion and migration of human colon cancer cells[J]. Shandong Medical Journal, 2017, **57**(18): 1-4.
- 王爱昆. 不同强化降脂方案对血脂未达标的冠心病患者糖脂代谢的影响[D]. 大连: 大连医科大学, 2024. DOI: 10.26994/d.cnki.gdlyu.2024.000224.
WANG Aikun. Effects of different intensive lipid-lowering regimens on glucose and lipid metabolism in coronary heart disease patients with suboptimal blood lipid control[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2024. DOI: 10.26994/d.cnki.gdlyu.2024.000224.
- Kanagalingam T, Lazarte J, Wong D K H, *et al.* Liver injury associated with ezetimibe monotherapy[J]. CJC Open, 2021, **3**(2): 195-197. DOI: 10.1016/j.cjco.2020.09.018.
- Tsai C C, Lin P P, Hsieh Y M, *et al.* Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*[J]. The Scientific World Journal, 2014(1): 690752. DOI: 10.1155/2014/690752.
- 李晶晶, 郭万春, 胡瑞峰, 等. 发酵肉制品中潜在改善高脂血症乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2023, **42**(7): 73-80. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2023.07.012.
LI Jingjing, GUO Wanchun, HU Ruifeng, *et al.* Screening and identification of lactic acid bacteria with potential to improve hyperlipidemia in fermented meat products[J]. China Brewing, 2023, **42**(7): 73-80. DOI: 10.11882/j.issn.0254-5071.2023.07.012.
- 章秀梅, 刘昭明, 黄翠姬, 等. 酸菜汁中乳酸菌的分离鉴定及其体外降胆固醇能力研究[J]. 中国调味品, 2011, **36**(11): 30-34. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9973.2011.11.009.
ZHANG Xiumei, LIU Zhaoming, HUANG Cuiji, *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented vegetables juice and the investigation of cholesterol-reducing capability[J]. China Condiment, 2011, **36**(11): 30-34. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9973.2011.11.009.
- 韩晶晶, 吕江涛, 张琴, 等. 高能脉冲电子束诱变筛选高产酒精酵母及其发酵条件优化[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, **29**(3): 154-158.
HAN Jingjing, LYU Jiangtao, ZHANG Qin, *et al.* Mutation and screening of high-alcoholic-yield yeast by HEPE and optimization of the fermentation condition[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2011, **29**(3): 154-158.
- 茅文俊, 刘真真, 朱虹, 等. 激光诱变筛选呼吸缺陷型酵母及其发酵条件优化[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, **27**(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2009.01.001.
MAO Wenjun, LIU Zhenzhen, ZHU Hong, *et al.* Selection of the respiration deficiency mutant yeast irritated by laser and optimization of the fermentation condition[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2009, **27**(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2009.01.001.
- 邵娜, 卫功元, 葛晓光, 等. 紫外线 γ 射线复合诱变筛选 S-腺苷甲硫氨酸和谷胱甘肽联产发酵菌株[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2010, **28**(2): 107-113. DOI: 10.3969/

- j.issn.1000-3436.2010.02.010.
- SHAO Na, WEI Gongyuan, GE Xiaoguang, *et al.* Complex mutagenesis of *Candida utilis* by UV and γ -rays for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2010, **28**(2): 107-113. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2010.02.010.
- 11 王连峰, 陈恒雷, 张军, 等. 阿魏菇多糖高产菌株筛选的离子束诱变和复合诱变对比研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, **27**(4): 248-252. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2009.04.011.
 - WANG Lianfeng, CHEN Henglei, ZHANG Jun, *et al.* The comparative study on screening of pleurotus polysaccharide high-yield strains by use of ion beam implantation and composite mutagenesis[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2009, **27**(4): 248-252. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2009.04.011.
 - 12 王雨辰, 王曙阳, 董妙音, 等. 重离子束辐照选育高产植物乳酸菌[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2017, **35**(1): 52-58. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2017.rj.35.010401.
 - WANG Yuchen, WANG Shuyang, DONG Miaoyin, *et al.* Study on screening and mutation breeding of high-yield *Lactobacillus plantarum* by heavy ion irradiation[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2017, **35**(1): 52-58. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2017.rj.35.010401.
 - 13 魏玲玲, 李小平, 霍乃蕊. 高降胆固醇嗜酸乳杆菌的紫外诱变选育[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2010, **30**(3): 274-277. DOI: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.2010.03.004.
 - WEI Lingling, LI Xiaoping, HUO Nairui. Screening of UV-mutated *Lactobacillus acidophilus* with high ability to degrade cholesterol[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2010, **30**(3): 274-277. DOI: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.2010.03.004.
 - 14 吴庆华, 陈积红, 张珍, 等. X射线对嗜热乳杆菌产L-乳酸的选育研究[J]. *食品工业科技*, 2015, **36**(3): 116-118. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.03.015.
 - WU Qinghua, CHEN Jihong, ZHANG Zhen, *et al.* Breeding study of *Lactobacillus thermophilus* induced by X-ray for L-lactic acid production[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, **36**(3): 116-118. DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.03.015.
 - 15 田雪娇. 重离子束辐照选育高产乳酸菌株及其发酵工艺技术研究[D]. 兰州: 中国科学院大学(中国科学院近代物理研究所), 2022. DOI: 10.27560/d.cnki.gkjwc.2022.000008.
 - TIAN Xuejiao. Breeding of high-yield lactic acid bacteria strains by heavy ion beam irradiation and research on fermentation technology[D]. Lanzhou: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences), 2022. DOI: 10.27560/d.cnki.gkjwc.2022.000008.
 - 16 许富强. 益生菌辅助碳离子放射治疗提高HER2阳性乳腺癌模型小鼠治疗效果及其对结肠癌模型预防作用研究[D]. 兰州: 中国科学院大学(中国科学院近代物理研究所), 2023. DOI: 10.27560/d.cnki.gkjwc.2023.000023.
 - XU Fuqiang. Probiotic-assisted carbon ion radiotherapy enhances therapeutic efficacy in HER2-positive breast cancer mouse models and its preventive effect on colon cancer models[D]. Lanzhou: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences), 2023. DOI: 10.27560/d.cnki.gkjwc.2023.000023.
 - 17 郭东起, 侯红漫, 刘阳, 等. 降胆固醇益生乳酸菌的体外筛选[J]. *中国乳品工业*, 2007, **35**(8): 11-14. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2230.2007.08.003.
 - GUO Dongqi, HOU Hongman, LIU Yang, *et al.* Screening of cholesterol-reducing *Lactobacillus in vitro* [J]. *China Dairy Industry*, 2007, **35**(8): 11-14. DOI: 10.3969/j.issn.1001-2230.2007.08.003.
 - 18 刘丽莉, 董铁有, 杨协立. 6种乳酸菌降解胆固醇的体外试验[J]. *河南科技大学学报(自然科学版)*, 2005, **26**(6): 85-88. DOI: 10.15926/j.cnki.issn1672-6871.2005.06.024.
 - LIU Lili, DONG Tieyou, YANG Xieli. Research on LAB degrading cholesterol[J]. *Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2005, **26**(6): 85-88. DOI: 10.15926/j.cnki.issn1672-6871.2005.06.024.
 - 19 李雅迪. 益生菌降胆固醇机制初探[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.
 - LI Yadi. Preliminary study on cholesterol-lowering mechanism of probiotics[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017.
 - 20 李尧. 降胆固醇乳酸菌的筛选与机制初探[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
 - LI Yao. Screening of cholesterol-lowering lactic acid bacteria and preliminary study on the mechanism[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017.
 - 21 孙晓琛. 降血脂功能乳酸菌的体外筛选及其降血脂机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2024. DOI: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2024.001673.
 - SUN Xiaochen. *In vitro* screening of lactic acid bacteria with lipid-lowering function and study on their lipid-

- lowering mechanism[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2024. DOI: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2024.001673.
- 22 张会. 降血糖功能乳酸菌的筛选\降糖机理及应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2023. DOI: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2023.001167.
ZHANG Hui. Screening of lactic acid bacteria with hypoglycemic function, hypoglycemic mechanism and application[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023. DOI: 10.27170/d.cnki.gjsuu.2023.001167.
- 23 朱萌茜. 调节糖、脂代谢乳酸菌的筛选及其功能评价[D]. 郑州: 河南工业大学, 2023. DOI: 10.27791/d.cnki.ghegy.2023.000967.
ZHU Mengqian. Screening of lactic acid bacteria regulating glucose and lipid metabolism and their functional evaluation[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2023. DOI: 10.27791/d.cnki.ghegy.2023.000967.
- 24 Bai J, Wang S Y, Xu F Q, *et al.* *L. reuteri* JMR-01 adjuvant $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation exerts anti-colon carcinoma effects by modulating the gut microbiota in mice[J]. International Journal of Radiation Biology, 2023, **99**(5): 779-791. DOI: 10.1080/09553002.2023.2142979.
- 25 李欢琴, 王文磊, 王昭凯, 等. 低能离子束生物技术的应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2016, **38**(2): 1-6. DOI: 10.14188/j.ajsh.2016.02.001.
LI Huanqin, WANG Wenlei, WANG Zhaokai, *et al.* Application of low energy ion beam biotechnology[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2016, **38**(2): 1-6. DOI: 10.14188/j.ajsh.2016.02.001.
- 26 罗曾义. D7超声乳化理论和技术[J]. 声学技术, 1996, **15**(4): 201-207.
LUO Zengyi. Theory and technology of D7 ultrasonic emulsification[J]. Technical Acoustics, 1996, **15**(4): 201-207.
- 27 贺珊珊, 李敏, 张艳. 一种含有胆固醇胶束的培养基溶液的制备方法: CN108795767A[P]. 2018-11-13.
HE Shanshan, LI Min, ZHANG Yan. Preparation method of culture medium solution containing cholesterol micelles: CN108795767A[P]. 2018-11-13.
- 28 朱丹凤, 王园园, 崔树茂, 等. 罗伊氏乳杆菌氮源利用的选择性与特征分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, **44**(11): 35-41. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017734.
ZHU Danfeng, WANG Yuanyuan, CUI Shumao, *et al.* Selectivity and characteristic analysis of nitrogen source utilized by *Lactobacillus reuteri*[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, **44**(11): 35-41. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.017734.
- 29 曾国庆, 蔡昀洁, 盛华洋, 等. 具有降胆固醇功能乳酸菌的筛选及其生物学特性评价[J]. 中国微生态学杂志, 2024, **36**(5): 540-548. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202405007.
ZENG Guoqing, CAI Yunjie, SHENG Huayang, *et al.* Screening of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering function and evaluation of its biological characteristics[J]. Chinese Journal of Microecology, 2024, **36**(5): 540-548. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202405007.
- 30 Miremadi F, Ayyash M, Sherkat F, *et al.* Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*[J]. Journal of Functional Foods, 2014, **9**: 295-305. DOI: 10.1016/j.jff.2014.05.002.
- 31 陈大卫, 梁娇娇, 程月, 等. 鼠李糖乳杆菌 hsrifm 1301 发酵乳在非酒精性脂肪肝细胞模型中对人肝细胞 L-02 的益生作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, **47**(11): 61-67. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026326.
CHEN Dawei, LIANG Jiaojiao, CHENG Yue, *et al.* Probiotic function of *Lactobacillus rhamnosus* hsrifm 1301 fermented milk on human hepatocyte L-02 in NAFLD cell model[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, **47**(11): 61-67. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.026326.
- 32 Liang X J, Lu L L, Wang N X, *et al.* SBF-1 suppresses colorectal cancer cell growth *via* modulating cholesterol metabolic reprogramming[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2026, **794**: 153046. DOI: 10.1016/j.bbrc.2025.153046.