**山羊奶的成分变化受益生菌影响**

摘要：

近年来的研究中，我们发现山羊奶比其他反刍动物的牛奶具有许多优势。一些牛奶物质会改变牛奶的质量，并且还会产生潜在的致癌活性。在我们的工作中，使用Ames试验测定了来自阿根廷北部不同地理位置的山羊奶的化学成分和诱变化合物。在Tucumán，分析了两个大型农场，其中一个靠近大豆养殖的La Perla农场，山羊奶显示788±33个菌落/平板；在Sunchales农场，牛奶含有655±51个菌落/平板；第三个是具有半广泛INTA农场的公共组织，Ames测试表明210±28个菌落/平板。山羊益生菌混合物（GPM）：罗伊氏乳杆菌DDL19，Lactobacillus alimentarius DDL48，Bifidobacterium，bifidum DDBA和屎肠球菌DDE39口服给药以减少有毒物质。用益生菌处理25天后的Ames试验显示455±47;分别从La Perla，Sunchales和INTA农场获得的山羊奶产生300±33和102±36个菌落/平板。处理50天后，Ames试验分别在来自La Perla，Sunchales和INTA农场的山羊奶中检测到289±23,126±26和60±5个菌落/平板。此外，益生菌给药并未改变牛奶的物理化学成分;除了脂肪酸外。牛奶的诱变能力的降低可以通过观察到的脂肪含量的改变。这些结果强化了先前通过GPM中包含的菌株吸附诱变剂的结果，并且定义了该主题的第一个科学结果。添加到山羊日粮中的GPM没有影响蛋白质和非脂肪固体含量，酸度和密度值，但允许获得特征在于改善有益化合物浓度的牛奶。该研究支持使用益生菌来提高山羊产品的质量。

1.简介：

全世界的山羊繁殖与边缘地区和贫穷国家有关。山羊的养殖系统是广泛的，并且使用有限的技术，这导致生产者的成本降低，但同时增加了影响肉和牛奶质量的因素。放牧经常发生在受生物因素影响的区域，例如霉菌毒素，植物的有毒天然成分，以及来自农业实践的土壤和/或水污染（种子处理，杀真菌剂，杀虫剂等）。通常，动物的饮用来源受到影响，一些前面提到的成分可能出现在动物产品中，特别是乳制品。此外，几种抗生素用于家畜以防止微生物感染并促进动物生长。然而，大约80％的抗生素在动物粪便中排泄到环境中，这促进了抗生素抗性菌株的发展。此外，在没有抗生素管理的动物肠道中发现了对抗生素有抗药性的细菌以及牛奶和山羊奶益生菌的使用可以避免或减少不足使用抗生素并产生健康益处和抗突变性。向动物饮食中添加益生菌为改善其健康提供了一个很好的选择（。这种情况正在转化为社会的好处，例如去除粪便样品中可能存在的诱变和致癌化合物。但是，它仍然是必要的;确定益生菌是否能够有效地消除可能存在于牛奶中的诱变剂。据我们所知，山羊奶根据其成分的诱变特性仍然未知。在合成中，益生菌混合物的施用降低了粪便中诱变剂的浓度。另一方面，相同的益生菌增加了乳中具有抗诱变性的多不饱和有机酸的浓度。因此，我们假设益生菌的使用也可能减少牛奶中的微量元素。本研究的目的是确定益生菌消费对山羊奶可能的诱变特性的影响。

2.材料和方法

2.1。细菌菌株

在这项研究中，我们使用由罗伊氏乳杆菌DDL 19，Lactobacillus alimentarius DDL 48，Bi fi dobacterium bi fi dum DDBA和屎肠球菌DDE 39整合的山羊益生菌（MGP）的混合物;每种菌株在适当的培养液中培养以1：1：1：1的比例混合，最终总浓度为1×10 9菌落形成单位（CFU）/ m L悬浮于无菌牛奶。鼠伤寒沙门氏菌TA98在25mg / mL氨苄青霉素存在下在营养肉汤I中生长。进行组氨酸需求，rfa突变，uvr B突变和R因子的测试以确定鼠伤寒沙门氏菌TA 98的基因型。在诱变性试验之前，鼠伤寒沙门氏菌细胞在37℃生长16-18小时直至达到1-2.10 8 CFU / m L.

2.2。哺乳山羊

在整个试验期间，每个农场都有10批成年哺乳山羊进行了这项工作。参加试验的山羊（三年的Saanen-Creole）的选择标准暗示它们是健康的，在过去的六个月中没有先前施用抗生素，这是他们的第二次产犊。检查乳房并且丢弃初始摄入中的山羊显示异常数量的体细胞。在测试过程中，他们没有抬起并与其他牛分开。在产犊的第20天和第22天之间，所有动物都开始使用益生菌。农场的地理位置不同，但在150公里以内。两个农场广泛饲养动物并采用传统方法。其中一个毗邻大豆种植的田地（La Perla），Taco Ralo，阿根廷Tucumán的地方;另外距离阿根廷图库曼的Lamadrid 23公里（Sunchales）地区。农场位于半湿润气候，海拔320米。第三个农场由一个政府组织控制;国家农业技术研究所（INTA），位于阿根廷卡塔马卡Sumalao。农场，半干旱气候，海拔505米。根据Apás等人的研究，在所有农场中，饮食包括苜蓿，玉米粒，盐和维生素和矿物质的复合物。在半广阔的农场中，山羊在早晨和晚上吃草和浏览，晚上它们留在畜栏中，同样的饲料供应给集约化养殖场的山羊。益生菌以10m L /天/山羊的剂量口服给药。管理协议类似于Apás等人描述的协议。涉及动物的所有程序，其处理和治疗均经伦理委员会批准用于动物。清洁山羊的乳房，将从挤奶中收集的全部牛奶收集在无菌小瓶中，混合并置于4℃。在益生菌施用25和50天之前和之后立即进行测定。将牛奶样品在-20℃下储存2天直至加工

2.3。山羊乳中诱变化合物的测定

山羊益生菌（MGP）混合物的抗诱变活性通过测量山羊乳样品中鼠伤寒沙门氏菌TA98突变的抑制来确定。当回复体菌落的数量至少是阴性对照产量的两倍（MUI≥2）时，样品被认为是诱变的，并且在方差分析中显示出显着的响应。诱变剂阳性对照是叠氮化钠Sigma-Aldrich（0.5μg/板）。阴性对照：鼠伤寒沙门氏菌TA 98在无菌蒸馏水中。阴性和阳性对照培养物给出每个平板的回复体数量在正常范围内，之前在我们的实验室中发现。

2.4。益生菌的抗突变活性

将得到的牛奶在磷酸盐缓冲液中稀释（1/50）。将100微升该稀释液与等体积的16-18小时鼠伤寒沙门氏菌TA 98菌株培养物（近似细胞密度2.0×10 8细胞/ ml）混合。将混合物在摇动器中搅拌（150rpm，120分钟，37℃）温育。然后将200μL与2m L顶层琼脂混合。用0.6％（w / v）琼脂，0.5％（w / v）Na Cl，补充0.5m ML-组氨酸（Sigma-Aldrich）和0.5m M d-制备用于Ames测定的顶部（覆盖）琼脂。生物素（德国默克）。然后将混合物轻轻混合并最后倒在含有葡萄糖琼脂（葡萄糖2％w / v和琼脂1.5％w / v）的平板上。当顶层琼脂固化后，将平板在倒置位置在37℃温育48小时，并计数其+回复菌落。根据Apás等人的研究，与对照（不含益生菌）相比，益生菌的抗突变活性被测量为用益生菌处理的样品中菌落数量的减少。

2.5。含有和不含益生菌的山羊奶样品的理化分析

使用超声波牛奶分析仪EKOMILK进行。测量了以下参数：脂肪，非脂肪固体，蛋白质，密度，酸度。根据HPLC方法测定组氨酸，用梯度色谱法和邻苯二甲醛（OPA）柱前衍生法测定生物氨基酸和胺

2.6。统计分析

将数据表示为平均值±标准差，并使用Info-Stat统计软件提交多变量ANOVA; P值<0.05被认为是统计学上的显着性。

3.结果和讨论

3.1。确定牛奶中诱变剂的研究

据我们所知，这是山羊奶中首次使用Ames试验。为了进行Ames试验，确定了实验条件。缺点之一是牛奶中含有的组氨酸和生物素的量可能使营养缺陷型生长，因此可能与假阳性结果有关。该技术仅需要基础浓度的组氨酸和生物素。根据先前的研究，山羊奶中含有组氨酸（0.89 mg / m L）和生物素（1.50 mg / m L）。在研究的山羊奶中，组氨酸的含量是介于（1.03-0.77 mg / m L）之间。 Ames测试“开始”其菌株所需的组氨酸和生物素浓度分别为：0.124 mg / m L和0.096 mg / m L. 因此，进行1:50的山羊奶稀释。 通过这种方式，最终浓度为：0.018（±0.003）mg / m L（组氨酸），我们假设根据以前的工作，生物素浓度可能接近0.030 mg / m L，这个值小于1.50 mg / m 必须产生假阳性。

3.2。牛奶中诱变剂的测定

为了评估诱变剂的存在，将牛奶样品进行Ames试验（表1）。三组牛奶超过对照值的两倍（13±1菌落/平板）。但是，INTA的价值最低。在农场之间发现的突变体数量存在显着差异。在山羊奶中发现的诱变剂较少，只吃所提供的饮食，并且其循环仅限于受控区域。同样在该地区，土壤的干燥几乎没有草药可以消耗。山羊在半密集区域饲养，可以在围栏外循环几个小时，在较潮湿的气候下食用牧草，牛奶中含有更多的诱变剂。但是，为了理解这一事实的真实价值，应该进一步研究。结果表明牛奶中存在诱变剂。因此，找到抗诱变剂非常重要。这组药剂包括天然和合成化合物。基于它们在抗突变体中的作用机制，可以区分几类化合物。这些是具有抗氧化活性的化合物抑制诱变剂活化的化合物;阻断剂;以及以几种作用方式为特征的化合物。先前报道了几种抗肿瘤化合物通过抗突变机制发挥作用。近年来，一些出版物的重点是筛选天然和合成化合物的有益突变/抗诱变性。存在于山羊乳中的共轭亚油酸（CLA）是已知的抗癌剂和抗肿瘤剂。之前证实了由于益生菌消耗而导致的CLA增加。相反，山羊奶的酪蛋白似乎没有抑制人类乳腺癌的来临. 益生菌具有抗诱变和抗癌特性。山羊益生菌减少了断奶期间肠道炎症和发育不良标记腐胺。对山羊益生菌饮食施用可能影响的评估（表1）显示，摄入MGP 25天后细菌突变体显着减少42％，54％和51％，50天后细菌突变体减少63％，81％和71％分别为La Perla，Sunchales和INTA农场摄取MGP。在我们的工作中，由于初始值较低，INTA的最终值低于其他农场。在处理50天后，在所有农场中，对于没有益生菌处理的样品（对照），MGP的使用减少了超过细菌突变体数量的三分之一。这些结果与MGP去除诱变剂的能力一致。在我们的实验室中，使用相同的山羊益生菌混合物测试了体外诱变剂去除能力。 MGP能够结合和解毒有效的诱变剂，这种特性可用于山羊的补充食品。诱变剂改良，改善小反刍动物健康和食品安全。 Hsieh和Chou也报道了益生菌结合的诱变剂，但作者研究了豆奶。先前报道了由干酪乳杆菌和双纤维芽孢杆菌保留fl毒素的能力。乳酸菌细胞壁成分与fl毒素的结合降低了其对健康的负面影响。帕德玛等人假设乳酸菌和诱变剂之间的相互作用是由于壁低分子量糖肽，并且保持力可能是每种诱变剂的特定原因。格林等人报道了热灭菌乳的氯仿提取物中的诱变活性。但是，他们没有说明涉及化学物质。

3.3分析加热牛奶的负致突变性。

为了了解益生菌饲料混合物对牛奶的物理化学参数的影响，确定了密度，酸度，脂肪，固体非脂肪和蛋白质浓度（表2）。在益生菌消耗25天后，产奶量增加，半大型农场产奶量增加11％至14％，INTA农场产奶量增加14％至17％。应该进行未来的研究，以确定其显着的意义和可能的原因。牛奶的化学成分决定了它的营养质量以及它作为乳制品行业原料的价值。我们的密度值：1.02-1.03±0.1（显示，不同农场的乳品之间没有显着差异（p≥0.05），而且与Frau等人发现的那些（1.029±0.002）一致。 （2012年）。在所有研究条件下（表2），酸度值相似（p≥0.05），与Frau报告的值（0.16±0.02）相似等。结果表明添加到山羊日粮中的益生菌混合物不影响酸度值。然而，每个农场的乳脂浓度在统计上是不同的。 La Perla，Sunchales和INTA的脂肪百分比分别为12,9和14。其他作者研究了混合品种Saanen山羊，他们报告的乳脂含量为3.4％±0.27和4.21％±0.52。在我们的结果中观察到的脂肪增加与我们小组以前的研究相关，与INTA Catamarca的山羊一起工作。哺乳山羊的MGP给药允许获得牛奶，其特征在于有益化合物（主要是CLA）的浓度提高。 Nadathur等人确定了由于细菌脂肪酶的作用而释放出的乳脂肪酸的效果。对牛奶的N-甲基，N'-硝基，N-亚硝基胍的抗突变性与酶活性成比例增加，表明释放的脂肪酸有助于增加抗突变性。同样，我们的结果（表2）表明益生菌治疗增加了山羊奶的脂肪浓度。在我们实验室以前的工作中，MGP能够在山羊奶中增加几种非饱和脂肪酸。从本研究中考虑的组中获得的脱脂乳固体（表2）的值显示它们之间没有显着的差异（p≥0.05）。它们与其他作者公布的结果一致：8.27±0.75，但它们比Oliszewski等人提供的结果更低（p≤0.05）。 （2002），11.02±0.12。就蛋白质而言，益生菌消耗不会增加牛奶的总蛋白质（表2）。这些值类似于Chacón（3.56±0.24）和Frau等人报道的值。（3.37±0.31），。最近So等人发表了关于益生菌介导的癌症抑制的综述。他们得出的结论是，尽管有令人鼓舞的实验室研究，但在我们从人体临床试验中获得更多结果之前，不应夸大与益生菌使用相关的好处。

4.结论

这些结果强化了这样的假设：向山羊日粮中添加益生菌可以为消费者提供食品安全，而不会影响山羊奶产品的感官特性，并为动物健康带来多重好处。在这项工作中使用的益生菌混合物减少了山羊奶中存在的诱变剂，这个前提定义了该主题的第一个科学结果。抗突变能力的增加可以响应观察到的脂肪含量的改变。本研究支持使用混合益生菌来提高山羊产品的质量。