مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، ویژه‌نامه ۱ - بهار ۱۳۸۸
www.jast.ir.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jast

بررسی اثر شیر سویا بر بقای باکتری‌های *Lactobacillus Acidophilus* در طی نگهداری نوشیدنی ماست پروبیوتیک

*تکتم یاسمنی‌فریمانی[1]، مرتضی خمیری[2] و مصطفی مظاهری‌تهرانی[3]

[1] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[2] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[3] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۲۵

چکیده

پری‌بیوتیک‌ها، ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی رشد یا فعالیت یک یا تعدادی از باکتری‌ها در روده، اثرات مفیدی را در میزبان به جای می‌گذارند. فرآورده‌های پروبیوتیک، در صورتی‌که در مقادیر مناسبی مصرف شوند، با بهبود میکروفلور داخلی بدن به‌طور مؤثری از نظر تغذیه‌ای و تأمین سلامت بر میزبان اثر می‌گذارند. مصرف فرآورده‌های سین‌بیوتیک (حضور هم‌زمان پروبیوتیک و پری‌بیوتیک) اثرات سودمندتری بر سلامت مصرف‌کننده دارد. در این مطالعه، اثر جایگزینی شیر سویا با شیر معمولی (حاوی ترکیبات پری‌بایوتیک) در ۳ سطح ۰، ۳۰ و ۵۰ درصد (وزنی/ وزنی) بر بقای *Lactobacillus Acidophilus* در طی ۶ هفته نگهداری بررسی شد. بررسی آماری نتایج نشان داد که جایگزینی شیر سویا سبب افزایش معنی‌دار در تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در مقایسه با نمونه شاهد گردید ($P<0/05$) و امتیاز طعم نمونه‌ها با افزایش درصد شیر سویا کاهش یافت. به‌طورکلی، در تمام نمونه‌ها با گذشت زمان نگهداری، تعداد باکتری‌های پروبایوتیک زنده، pH و مطلوبیت طعم کاهش و اسیدیته افزایش یافت. کلیه نمونه‌های دارای شیر سویا، در پایان دوره نگهداری کمترین تعداد باکتری‌های پروبایوتیک (۶ log CFU/g)، طبق استاندارد IDF/FIL برای محصولات پروبایوتیک را داشتند.

واژه‌های کلیدی: شیر سویا، *Lactobacillus Acidophilus*، نوشیدنی ماست پروبایوتیک، نگهداری

مقدمه

نوشیدنی ماست[1] با رقیق‌سازی ماست تولید می‌شود و ماست نیز با افزودن دو استارتر *Lactobacillus Acidophilus* زیرگونه *بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* به شیر تولید می‌گردد (تیم و مارشال، ۱۹۹۷). در طی تخمیر، برخی متابولیت‌های میکروبی بهبوددهنده طعم و خصوصیات سلامتی‌بخش محصول تولید می‌شوند (بودز و همکاران، ۱۹۹۰؛ وشید و همکاران، ۲۰۰۲)، و این ویژگی‌ها با غنی‌سازی ماست و محصولات آن با باکتری‌های پروبیوتیک افزایش می‌یابد.

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای می‌باشند که با حفظ توازن فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر روی میزبان دارند (فولر، ۱۹۸۹). این اثرات را می‌توان از چند جنبه ضدمیکروبی، شیمیایی، تغذیه‌ای، فیزیولوژیک و ایمونولوژیک مورد بررسی قرار داد. جلوگیری از اسهال، تقویت سیستم ایمنی بدن و تولید برخی از ویتامین‌ها از

* - مسئول مکاتبه: (yasamani@yahoo.com)

1- Drinking Yogurt

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جمله این اثرات مفید است (کیلاساپاتی و ریبک، ۱۹۹۷). برای حفظ تأثیرگذاری پروبایوتیک‌ها، گونه مورد استفاده باید در ماده غذایی حامل تا زمان مصرف و رسیدن به دستگاه گوارش زنده بماند. در سال‌های اخیر برای استفاده بهتر از فرآورده‌های پروبیوتیک ترکیبات دیگری نیز جهت تقویت رشد پروبیوتیک‌ها به‌طور هم‌زمان استفاده می‌گردد که به پری‌بیوتیک‌ها معروفند. پری‌بیوتیک‌ها، ترکیبات غذایی غیرقابل هضمی هستند که با تحریک انتخابی رشد یا فعالیت یک یا تعدادی از باکتری‌ها در روده، اثرات مفیدی را در میزبان به جای می‌گذارند (همن و مارث، ۱۹۸۳).

پروبیوتیک‌ها معمولاً در شیر گاو رشد مناسبی ندارند (چانمین و همکاران، ۲۰۰۵). در بسیاری از بررسی‌ها سویا به‌عنوان محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک به‌کار رفته است (چو و هو، ۲۱۰۰؛ فریورت و همکاران، ۲۰۰۷؛ مارتینز ویلالونگا و همکاران، ۲۰۰۳). نقش الیگوساکاریدهای سویا در افزایش جمعیت بیفیدو باکتری‌ها در برخی بررسی‌ها به اثبات رسیده است (چی‌زانگ و همکاران، ۲۰۰۲؛ وینزولا و رینهمر، ۱۹۹۹). بیفیدو باکتری‌ها دارای فعالیت آلفا گالاکتوزیداز هستند و توانایی استفاده از قندهایی، مانند رافینوز و استاکیوز موجود در سویا را داشت، و همچنین فعالیت پروتئولیزی کافی جهت رشد در شیر سویا را دارند (کمالی، ۱۹۹۷).

با توجه به این‌که فرآورده‌های سویا به تنهایی دارای قابلیت بازداری بیماری‌های مزمن مانند سرطان، نرم استخوانی، پوکی استخوان و اختلالات پلاستیکی و بسیاری بیماری‌های دیگر و همچنین خواص تغذیه‌ای و سلامتی بخشی فراوانی می‌باشند (اندرسون و همکاران، ۱۹۹۹)، از این‌رو ساخت فرآورده‌های پروبایوتیک با پایه سویا می‌تواند منجر به تولید فرآورده‌های سلامتی بخش کم‌نظیر شود.

در این پژوهش اثر شیر سویا به‌عنوان پری‌بیوتیک بر تعداد باکتری‌های *Lactobacillus Acidophilus* اسیدیته، pH و طعم نوشیدنی ماست پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: شیر پاستوریزه و هموژنیزه از کارخانه شیر پشیر خراسان، آرد سویا از کارخانه صنایع پروتئینی توس سویا (مشهد)، آغازگر ماست با کد تجاری (DVS Lac 13) شامل استرپتوکوکوس فلیوکی زیرگونه بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس و استارتر پروبیوتیک شامل *Lactobacillus Acidophilus* از شرکت آزمایش شرق (مشهد)، محیط کشت MRS-A[1] و آب پپتون، محلول سود ۰/۱ نرمال و معرف فنل فتالئین، بافر ۴ و ۷ برای کالیبره کردن pH متر از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

روش تهیه شیر سویا: برای تهیه شیر سویا با ماده جامد کل (۱۰/۸+۰/۲) (مشابه با شیر به‌کار رفته در فرمولاسیون)، آرد کامل سویا (هر ۱۰۰ گرم محتوی ۳۵ درصد پروتئین، ۲۲ درصد چربی، ۳۳ درصد کربوهیدرات) به نسبت ۱ به ۷ به آب در دمای ۸۰-۷۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و در همزن با دور بالا به‌مدت ۱۵ دقیقه کاملاً مخلوط شد، سپس به سرعت تا دمای حدود ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و با پارچه صافی‌هایی با مش بسیار ریز ۲ بار صاف، و سپس شیر سویای به‌دست آمده در حمام آب سرد تا دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

تهیه نوشیدنی ماست پروبیوتیک: شیر پاستوریزه با ماده جامد کل (۱۰/۸+۰/۲) و شیر سویای آماده شده با ماده جامد مشابه در نسبت‌های وزنی ۱۰۰ درصد، ۷۰-۳۰ درصد و ۵۰-۵۰ درصد مخلوط شده و در فشار ۷۰ بار در هموژنایزر مدل آرمفیلد fl9 ساخت کشور انگلستان هموژن گردید و سپس مخلوط هموژن شده به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰-۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. به‌منظور آماده‌سازی استارتر ماست در مقیاس کوچک طبق دستور کار شرکت سازنده آن، ۴ درصد به ۱۰-۵ میلی‌لیتر از مخلوط در دمای ۴۵-۴۲ درجه سانتی‌گراد

1- Acidified MRS Agar

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

اضافه و مدت ۱۵ دقیقه در اینکوباتور ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این زمان محلول استارتر به مخلوط اصلی افزوده و در گرمخانه تا رسیدن pH محصول به ۴/۵-۴ قرار داده شد سپس نمونه‌ها از گرمخانه خارج و تا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند. در نهایت محصول تخمیر شده شیر/ شیر سویا، تا ماده جامد کل ۴/۵ درصد با آب رقیق گردید، میزان نمک ۱ درصد بود که در همه نمونه‌ها ثابت در نظر گرفته شد.

pH نهایی محصول: به‌وسیله محلول اسید سیتریک ۵۰ درصد در pH ۴ ثابت شد. سپس در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌منظور غیرفعال کردن باکتری‌های موجود حرارت داده شدند، سپس ۱۰ درصد مایه تلقیح آماده شده دارای باکتری‌های *Lactobacillus Acidophilus* به نمونه‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد افزوده شد. نمونه‌ها در حمام آب سرد تا دمای حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد سرد شدند و در ظروف استریل مناسب بسته‌بندی شد و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون‌ها

۱- اندازه‌گیری pH و اسیدیته: pH با استفاده از pH متر Metrohm مدل ۶۹۱ ساخت سوئیس و اسیدیته طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ هر هفته در طول ۶ هفته انجام گرفت (استاندارد ملی ایران ۲۸۵۲، ۱۹۹۲).

۲- شمارش باکتری‌های پروبیوتیک: برای شمارش باکتری‌های *Lactobacillus Acidophilus* ۱ میلی‌لیتر از نوشیدنی توسط ۹ میلی‌لیتر محلول پپتون واترامستریل (۱ درصد) ۶ بار به‌طور متوالی رقیق شده و پس از یکنواخت شدن، ۱ میلی‌لیتر از ۴ رقت آخر در ۳ تکرار در ۲ پلیت به روش پور پلیت[1] کشت داده شد و سپس پلیت‌ها در شرایط هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز قرار گرفتند (ویترولا و رینهمیر، ۱۹۹۹). پس از ۳ روز گرمخانه‌گذاری شمارش کلی[2] باکتری‌های پروبیوتیک توسط کنتی کانتر هر هفته در طول ۶ هفته صورت گرفت.

۳- ارزیابی حسی: به‌منظور ارزیابی حسی نمونه‌ها از ۱۰ داور که آموزش‌های لازم را برای این کار دیده بودند استفاده شد. نمونه‌ها از لحاظ طعم با هم مقایسه شدند و از آنجایی که ارزیابی داوران به‌صورت کیفی است، با استفاده از آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای ارزیابی‌های کیفی به داده‌های کمی تبدیل شد. برای بررسی میزان تغییر طعم در طی دوره نگهداری نمونه‌ها یکبار پس از تولید و یکبار ۶ هفته پس از تولید ارزیابی شدند (لاولس و هایمان، ۱۹۹۸).

طرح آماری: همه آزمایش‌ها در قالب طرح اسپیلت پلات در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل جایگزینی شیر سویا در ۳ سطح و زمان در ۷ سطح بود. در مجموع ۶۳ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mstatc و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام، و رسم منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

اثر افزایش شیر سویا بر بقای *Lactobacillus Acidophilus*

شکل ۱ بقای *Lactobacillus Acidophilus* در نمونه‌هایی با درصدهای مختلف شیر سویا را در طی ۶ هفته نگهداری نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش درصد شیر سویا در نمونه‌ها تعداد باکتری‌های زنده *Lactobacillus Acidophilus* افزایش یافته است. در تمام نمونه‌ها، تعداد باکتری‌های زنده در طی ۶ هفته کاهش یافت. کاهش در تمام نمونه‌ها در طی ۶ هفته اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) داشته است.

1- Pour Plate Method

2- Total Count

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

source	Degrees of freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Probe
زمان	۵	٦٤/٦٦٤	١٢/٨٤٥	١٣٤/٦٨٢٧	٠/٠٠١

شکل ۱– اثر افزایش شیر سویا بر بقای *Lactobacillus Acidophilus* در نمونه‌ها در طی ٦ هفته.

از عوامل مؤثر در کاهش تعداد سلول‌های زنده *Lactobacillus Acidophilus* می‌توان به افزایش اسیدیته، حساسیت به اکسیژن و متابولیت‌ها و باکتریوسین‌های تولید شده به‌وسیله باکتری‌های لاکتیک اسید اشاره کرد.

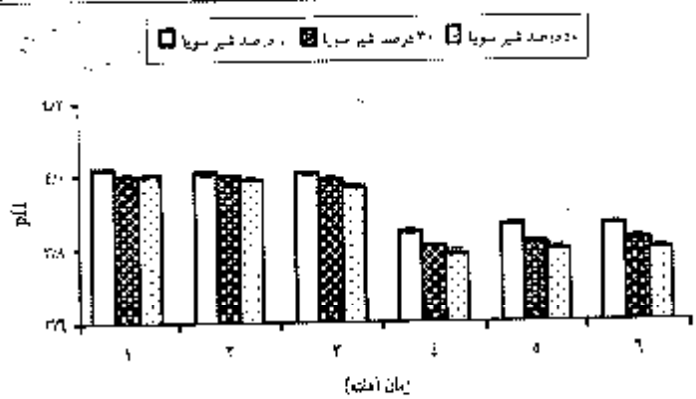
به‌رغم بالاتر بودن میزان جزئی اسیدیته در نمونه‌های با میزان سویای بالاتر، بقای باکتری‌ها در این نمونه‌ها بیشتر بوده، بطوری‌که در ۵۰ درصد شیر سویا بیشترین بقای *Lactobacillus Acidophilus* مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت علاوه‌بر کاهش pH و افزایش اسیدیته عوامل دیگری در کاهش تعداد باکتری‌های زنده در طی نگهداری محصول دخالت دارند. حضور الیگوساکاریدهای سویا در شیر سویا یکی از دلایل بقای بیشتر این باکتری‌هاست. شیر سویا نه تنها سبب افزایش بقا می‌شود بلکه رشد را نیز تقویت می‌کند. مارتینز ویلالونگا و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که بقای *Lactobacillus Acidophilus* در شیر تخمیری دارای الیگوساکاریدهای خانواده رافینوز بیشتر است. در این پژوهش تعداد باکتری‌های زنده در تمامی نمونه‌های حاوی شیر سویا در پایان هفته ششم بالاتر از استاندارد[1] (IDF/FIL) بوده است (ویترولا و رنهمپی، ۱۹۹۹).

1- International Dairy Federation/Federation International de Laiterie

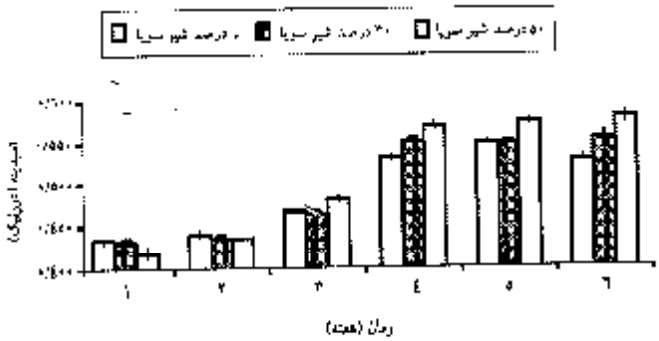
اثر افزایش شیر سویا بر pH و اسیدیته: نتایج اندازه‌گیری pH نمونه‌ها در طی زمان نشان داد که کاهش pH در طی ۳ هفته اول در سطح $P<0/05$ معنی‌دار نبود و از هفته ۳ به ٤ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و تا هفته ششم تقریباً ثابت ماند (شکل ۲). علت این امر، فعالیت تجزیه باکتری‌ها در طی زمان نگهداری می‌باشد. pH نمونه‌های با میزان شیر سویای بالاتر در طی زمان کاهش بیشتری می‌یابد ولی این اختلاف در سطح $P<0/05$ معنی‌دار نبود. علت کاهش بیشتر pH در نمونه‌های با درصد شیر سویای بالاتر را می‌توان تعداد باکتری‌های زنده بیشتر در نمونه‌های حاوی شیر سویای بالاتر و در نتیجه تولید بیشتر اسید لاکتیک در طی زمان دانست. چی‌والگ و همکاران (۲۰۰۲) نتیجه گرفتند که بین کاهش تعداد سلول‌ها و pH همبستگی وجود دارد و کاهش pH عامل اصلی در کاهش تعداد سلول‌ها می‌باشد.

همچنین فرنورث و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که، کاهش pH در نمونه‌های تخمیری شیر سویا سریع‌تر از شیر گاو اتفاق می‌افتد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۲- اثر افزایش شیر سویا بر pH نمونه‌ها در طی ۶ هفته.

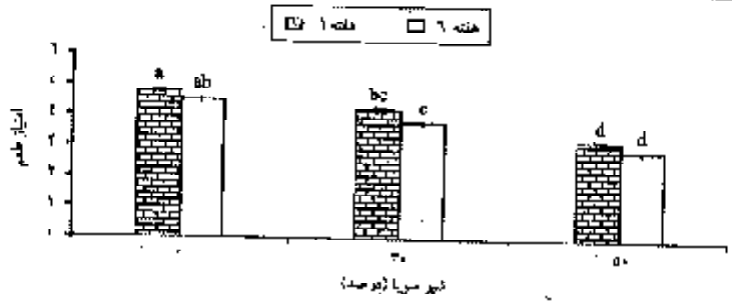


شکل ۳- اثر افزایش شیر سویا بر میزان اسیدیته در نمونه‌ها در طی ۶ هفته.

شکل ۳ روند افزایش اسیدیته را در نمونه‌های حاوی درصدهای مختلف شیر سویا نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان اسیدیته در نمونه‌های با شیر سویای ۵۰ درصد بیشترین مقدار بوده ولی این اختلاف اسیدیته در نمونه‌ها معنی‌دار نبود. اسیدیته نمونه‌ها در طی زمان، از هفته اول تا هفته چهارم روند افزایشی داشت که این افزایش فقط ازهفته سوم به چهارم معنی‌دار بود و پس از هفته چهارم تا پایان زمان مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری میان مقدار اسیدیته نمونه‌ها مشاهده نشد.

ارزیابی حسی: شکل ٤، میانگین امتیاز طعم نمونه‌های دارای درصدهای مختلف شیر سویا را در طی زمان نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که اثر متقابل درصد شیر سویا و زمان در سطح ($P<0/05$) بر طعم نمونه‌ها معنی‌دار بوده و با افزایش میزان شیر سویا و زمان، میانگین طعم کاهش یافت. طعم شیر سویا و همچنین افزایش میزان اسیدیته نمونه‌ها، سبب کاهش میانگین طعم می‌شود. یک راه‌حل مناسب برای این مسأله استفاده از طعم‌دهنده‌های مختلف می‌باشد.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ٤- اثر مقابل زمان و مقدار شیر سویا بر طعم نمونه‌ها

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی بررسی نتایج نشان داد که جایگزینی درصدی از شیر با شیر سویا اثر مطلوبی بر رشد و بقای گونه پروبیوتیک مورد نظر داشت و همه نمونه‌های حاوی شیر سویا در پایان هفته ۶، طبق استاندارد FIL/IDF کمترین تعداد باکتری‌های زنده (۶ log CFU/g) برای محصولات پروبیوتیک را دارا بودند. ولی با افزایش میزان شیر سویا و همچنین گذشت زمان امتیاز طعم کاهش یافت. هر چند ارزش اساسی مواد غذایی سلامتی بخش، خواص سلامتی بخشی و به‌ویژه ترویجی آنهاست، اما به‌دلیل اثر بر میل و رغبت مصرف‌کننده خواص حسی آنها نیز از اهمیت فراوان برخوردار است و ارزش جذاب ماده غذایی را شامل می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده استفاده از شیر سویا در تولید این نوشیدنی به‌دلیل اثرات سلامتی بخش مطلوب، مناسب می‌باشد ولی برای پذیرش بهتر محصول توسط مصرف‌کننده باید از روش‌های مختلفی برای بهبود خصوصیات حسی نوشیدنی از جمله استفاده از طعم‌دهنده‌های مختلف استفاده کرد.

منابع

1. Anderson, J.B., Anthony, M., Messina, M., and Garner, S.C. 1999. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. Cultured Dairy Products Journal, 29: 2. 20-24.
2. Boudraa, G., Touhami, M., Pochart, P., Soltana, R., Mary, J.Y., and Desjeux, J.F. 1990. Effect of feeding yogurt versus milk in children with persistent diarrhea. Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, 11: 509-512.
3. Champagne, C.P., Roy, D., and Gardner, N. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45: 1. 61-84.
4. Chieh Wang, Y., Chui Yu, R., and Chun, C.C. 2002. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. Food Microbiology, 19: 501-508.
5. Chou, C.C., and Hou, J.W. 2000. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. International Journal of Food Microbiology, 56: 113-121.
6. Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.P., Gardner, N., and Fliss, I., Champagne, C. 2007. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. International Journal of Food Microbiology, 16: 174-181.
7. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bact. 66: 365-378.
8. Hamann, W.T., and Marth, E.H. 1983. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. Journal of Food Protection, 47: 10. 781-786.
9. Institute of standards and Industrial Research of Iran, milk, No 2852, Tehran, 1992.
10. Kailasapathy, K., and Rybka, S. 1997. *L. acidophilus* and *bifidobacterium* spp.-their therapeutic potential and survival in yoghurt. Aust. J. Dairy Technol. 52: 28-33.
11. Kamaly, K.M. 1997. *Bifidobacteria* fermentation of soybean milk. Food Research International, 30: 9. 675-682.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

12.Lawless, H.T., and Hymann, H. 1998. Sensory evaluation of food: principle and practice. The First Edition, Chpman and Hull Publication, New York, NY, Pp: 113-121.

13.Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez, R., and Vidal-Valverde, C. 2003. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. International Dairy Journal, 16: 768-774.

14.Rachid, M.M., Gobbato, N.M., Valdez, J.C., Vitalone, H.H., and Perdigon, G. 2002. Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis. International Journal of Immmopathology and Pharmacology, 15: 209-216.

15.Tamime, A.Y., and Marshall, V.M.E. 1997. Microbiology and technology of fermented milks. In: Law, B. (Ed.), Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. (Second edition). Blackie Academic Co., London, Pp: 55-57.

16.Vinerola, C.G., and Reinhemir, J.A. 1999. Culture media enumeration of *Bifidobacterium biflum* and *lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. International Dairy Journal, 9: 497-505.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com