

Vida Útil de Leite Desnatado Pasteurizado Lactose-Hidrolisado Microfiltrado

Shelf Life of Pasteurized, Lactose-Hydrolyzed, Microfiltered Skim Milk

Leila Maria Spadoti^{a*}; Adriana Torres Silva e Alves^b; Adriane Elisabete Costa Antunes^c;
 Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá^d; Alcina Maria Liserre^e; Ariene Gimenes Fernandes Van Dender^f;
 Izildinha Moreno^g; Fabiana Katia Helena de Souza Trento^h; Darlila Aparecida Gallinaⁱ

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi adaptar a tecnologia de processamento de leite lactose-hidrolisado introduzindo a microfiltração neste processo, para obtenção de leite de vida estendida destinado a pessoas com intolerância à lactose, síndrome que atinge mais da metade da população adulta mundial. Leite desnatado pasteurizado foi lactose-hidrolisado com o uso da enzima beta-galactosidase (0,4 mL/L, por 21 horas, a 10±1°C) de modo a se obter uma hidrólise de pelo menos 90%. O leite lactose-hidrolisado foi microfiltrado em unidade piloto de microfiltração, equipada com membranas cerâmicas UTP (diâmetro médio de poro de 1,4 µm), envasado e armazenado a 5°C, por 40 dias. Durante a estocagem, os produtos foram submetidos a análises físico-químicas e microbiológicas para determinação de sua vida útil. Foram adotados, como critérios para determinação desse período, parâmetros microbiológicos e físico-químicos definidos pela legislação e por estudos científicos. O produto final apresentou-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação, sendo que, pelas análises físico-químicas teve vida útil entre 15-20 dias e pela avaliação microbiológica entre 20-25 dias. Conclui-se que leites desnatados pasteurizados lactose hidrolisados microfiltrados com características físico-químicas e microbiológicas exigidas pela legislação podem ser obtidos com vida de prateleira de 15 a 20 dias a 5°C.

Palavras-chave: Látceos. Lactase. Microfiltração. Proteólise. Microbiologia.

Abstract

The objective of this study was to adapt the processing of lactose-hydrolyzed milk by integrating a microfiltration step to obtain an extended shelf-life milk intended for people suffering from lactose intolerance, a condition affecting more than half of the world's population. Pasteurized skim milk was lactose-hydrolyzed by β -galactosidase (0,4 mL/L, for 21 hours, at 10±1°C) to a degree of at least 90%. The lactose-hydrolyzed milk was processed in a microfiltration pilot-plant, equipped with ceramic UTP membranes (average pore diameter 1,4 µm), packaged and stored at 5°C, for 40 days. During storage, the products were subjected to physical-chemical and microbiological analyses to determine the shelf life. The criteria set to determine the shelf-life of the product were based on microbiological and physical-chemical parameters established by the legislation and the efficacy of which has been confirmed by a series of scientific studies. The final product complied with all the requirements of any applicable standards and regulations, with the physical-chemical characteristics indicating a shelf-life of between 15-20 days, which could be extended further to 20-25 days if only microbiological quality parameters were to be considered. It was concluded that pasteurized, lactose-hydrolyzed, microfiltered skim milks complying with all the quality requirements specified by national legislation can be obtained with a shelf life of 15 to 20 days at 5°C.

Keywords: Dairy products. Lactase. Microfiltration. Proteolysis. Microbiology.

^a Doutora em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: lspadoti@ital.sp.gov.br.

^b Doutora em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: atorres@ital.sp.gov.br.

^c Doutora em Alimentos e Nutrição - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP). E-mail: adriane.antunes@fca.unicamp.br.

^d Doutora em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: pblumer@ital.sp.gov.br.

^e Doutora em Ciência de Alimentos - Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: alcina.maria@ital.sp.gov.br.

^f Doutora em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: adender@ital.sp.gov.br.

^g Doutora em Ciência de Alimentos - Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: imoreno@ital.sp.gov.br.

^h Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade de São Paulo (USP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: fabiana@ital.sp.gov.br.

ⁱ Doutora em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Pesquisadora Científica do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). E-mail: darlila@ital.sp.gov.br.

* Endereço para correspondência: Rua Hermantino Coelho, 77, Bloco 2, apto 133, Bairro Mansões Santo Antônio, Campinas, SP, CEP: 13087-500.

1 Introdução

No Brasil, assim como nos demais países, vários indivíduos apresentam aumento progressivo da síndrome da intolerância à lactose com a idade, comprometendo o consumo de leite e derivados entre adultos e idosos. Esta intolerância é caracterizada pela incapacidade do organismo em digerir esse carboidrato (lactose), resultando em diarreia osmótica, cólicas, flatulência, dor e distensão abdominal. Ocorre, essencialmente, devido à deficiência da enzima lactase, que atinge cerca de 70% da população adulta mundial, podendo ser primária (permanente) ou secundária (temporária, causada por dano à mucosa intestinal)^{1,2}.

Embora esse problema seja relacionado ao consumo de leite, este produto e seus derivados são importantes fontes

de minerais, vitaminas e proteínas de alto valor biológico, sendo que sua inclusão na dieta se relaciona à prevenção de osteoporose (que afeta 10 milhões de brasileiros), hipertensão arterial (terceiro principal fator de risco da mortalidade mundial), câncer de cólon, tensão pré-menstrual, litíase renal e no controle do peso corpóreo^{3,4}.

Desta forma, uma alternativa para o consumo de leite por intolerantes à lactose é a oferta de leite tratado com lactases comerciais, chamado de leite com baixo teor de lactose. No Brasil, encontram-se leites com baixo teor de lactose do tipo longa-vida (UHT – *ultra high temperature*) integrais ou semi-desnatados. Não há versões desnatadas e/ou pasteurizadas destes produtos. Contudo, o leite desnatado contém menor teor calórico que o integral ou semi-desnatado, sendo bom aliado para a saúde cardiovascular⁵.

O leite UHT apresenta uma característica de sabor cozido ou aquecido⁶. Além disso, no caso do leite lactose-hidrolisado UHT, o mesmo pode se apresentar mais escuro, devido a maior intensidade da Reação de Maillard. Neste contexto, os métodos de conservação do leite que usam temperaturas mais amenas, como a pasteurização e/ou a microfiltração, são alternativas para minimizar esses possíveis problemas.

A microfiltração é um processo que remove, por meio de membranas semipermeáveis, a maior parte da carga bacteriana do leite. O uso dessa tecnologia, associada à pasteurização, possibilita a obtenção de leite pasteurizado com maior vida útil, fato confirmado por Elwell e Barbano (2006)⁶. Além disso, segundo Vieira *et al.* (2007)⁷, o uso dessa combinação de tecnologias é economicamente viável.

Existem poucos estudos publicados com leite microfiltrado pasteurizado, sendo que as pesquisas realizadas relatam que a vida de prateleira desse produto não tem sido limitada por crescimento microbiano, mas sim pela ocorrência de uma atividade proteolítica (proteólise) suficiente para produzir defeito de sabor detectável sensorialmente^{6,8}.

O desenvolvimento de produtos que atendam às necessidades nutricionais especiais de segmentos da população torna-se cada vez mais importante para a manutenção da saúde e do bem estar. Portanto, o desenvolvimento do leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado justifica-se pela existência de grande parcela de consumidores, no Brasil e no mundo, que apresentam intolerância à lactose e que não querem abrir mão dos benefícios nutricionais proporcionados pelo leite.

O objetivo deste estudo foi adaptar a tecnologia de processamento de leite lactose-hidrolisado, com a introdução da etapa de microfiltração, para obtenção de um leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado (**LDPLHM**), bem como a determinação da vida útil do produto estocado a 5°C por meio de análises físico-químicas e microbiológicas.

2 Material e Método

Neste estudo foram realizados 3 processamentos, em datas distintas, entre final de 2008 e primeiro semestre de 2009, para obtenção de leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado. Em cada processamento foram utilizados de 100 a 130 litros de leite pasteurizado (Salute). Para padronização dos processamentos, na etapa de hidrólise utilizou-se sempre leite pasteurizado com um dia de envase.

O leite pasteurizado recebido foi colocado em galões plásticos de 50 L e misturado com a enzima beta-galactosidase (lactase) (E.C.3.2.1.23 - Prozyn), na concentração de 0,4 mL/L. O leite com a lactase foi mantido a 10±1°C, por cerca de 21 H, de modo a se obter um grau mínimo de hidrólise de 90%. Esta combinação de concentração, tempo e temperatura de reação foi adotada após a realização de testes preliminares para verificar a melhor opção de uso da enzima, considerando custos e aspectos tecnológicos (proliferação microbiana, acidez e grau de hidrólise mínimo de 90%).

O grau de hidrólise da lactose foi avaliado por crioscopia⁹, em crioscópio digital Laktron M90, considerando que a completa hidrólise de uma solução a 5% de lactose resulta numa depressão do ponto de congelamento de -0,273°C(-0,282°H)¹⁰. Este resultado foi posteriormente confirmado por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), segundo Burgner e Feinhberg (1992)¹¹.

As condições para análise cromatográfica foram as seguintes: cromatógrafo composto por coluna Nucleosil 100-5 NH₂ 250 x 4,6 mm, 5 µm (Macherey-Nagel); temperatura da coluna: 40°C; fase móvel: acetonitrila + água deionizada (75:25, v/v), filtrada e desgaseificada; vazão da fase móvel: 1 mL/min (constante); válvula de injeção tipo Reodyne com *loop* de 20 µL; detector de índice de refração a 40°C; bomba isocrática ProStar modelo 210 – Varian; detector de índice de refração ProStar modelo 350 – Varian; forno de coluna HotColumn - Cromacon Ciola; injetor Rheodyne e software de aquisição de dados Borwin versão 1.50.

Após a realização da hidrólise da lactose, o leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado foi aquecido a 48±2°C e submetido à microfiltração, em uma unidade piloto de microfiltração - MS1 (Tetra-Laval, França), equipada com membranas cerâmicas UTP Membralox (Societe Des Céramiques Techniques, Bazet, França), com tamanho médio de diâmetro de poro de 1,4 µm. O leite microfiltrado foi envasado em garrafas de vidro estéreis (frasco tipo SCHOTT), resfriado em banho de gelo e estocado em câmara fria a 5±1°C.

O LDPLHM recém obtido foi submetido às seguintes análises microbiológicas: microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, bolores e leveduras, coliformes a 30-35°C, coliformes termotolerantes ou a 45°C, estafilococos coagulase positivo e *Salmonella* sp., segundo American Public Health Association (2004)¹².

Com 1 dia de estocagem refrigerada, foram realizadas no produto as seguintes análises físico-químicas: densidade¹³, pH (via potenciômetro digital com eletrodo de vidro combinado modelo MICRONAL B-375), acidez¹³, extrato seco total¹⁴, gordura¹³, cinzas¹⁵, nitrogênio não caseínico (NNC)¹⁶, nitrogênio não protéico (NNP)¹⁷, nitrogênio total (NT)¹⁷ e proteína total (teor calculado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Posteriormente, a cada 5 dias, durante um período de 40 dias, os produtos foram avaliados em relação a pH, acidez¹³ e proteólise. Para determinação da proteólise empregou-se metodologia de Santos et al. (2003)⁸ que avalia a proteólise do leite através do chamado índice de proteólise (IP). Este índice corresponde à diminuição da caseína (CN) como porcentagem da proteína verdadeira (PV), onde: $CN = (NT - NNC) \times 6,38$ e $PV = (NT - NNP) \times 6,38$, sendo os valores de NT, NNP e NNC obtidos conforme descrito anteriormente. As médias (n=3 processamentos) dos resultados obtidos foram submetidas à análise estatística, empregando-se análise de variância e teste de Tukey, com nível de 5% de significância, por meio do programa SAS 8.12 (SAS Institute Ins, Cary, NC, USA).

Neste estudo, considerou-se que o LDPLHM atingia o fim de sua vida útil, do ponto de vista físico-químico, quando o mesmo apresentava valores de acidez fora dos limites recomendados pela legislação¹⁸ e/ou um índice de proteólise igual ou superior a 4,76%, valor que torna detectável a presença de sabor estranho e/ou amargo no leite⁸.

Pesquisas sobre leite microfiltrado pasteurizado^{6,8} relatam que a vida de prateleira do produto não tem sido limitada por crescimento microbiano, mas pelo aparecimento de defeitos de sabor devido à atividade proteolítica. Por este motivo, durante os 40 dias de armazenamento refrigerado dos LDPLHMs, análises microbiológicas foram realizadas apenas no segundo processamento. Essas análises foram: determinação de aeróbios mesófilos, coliformes a 30-35°C e coliformes termotolerantes ou a 45°C¹².

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização microbiológica e físico-química dos LDPLHM

A caracterização microbiológica e físico-química média, dos leites deslactosados microfiltrados utilizados nos 3 processamentos realizados, é apresentada, respectivamente, nas tabelas 1 e 2.

A avaliação microbiológica demonstrou que o uso combinado dos processos de pasteurização e microfiltração resultou na obtenção de produto com boa qualidade higiênico-sanitária (tabela 1).

Tabela 1 - Resultados das análises microbiológicas das amostras de leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado obtidas dos 3 processamentos

Microrganismos	Processamentos		
	Primeiro	Segundo	Terceiro
Mesófilos aeróbios (log UFC.mL ⁻¹) ⁽¹⁾	< 1	< 1	< 1
Aeróbios psicrotróficos (log UFC.mL ⁻¹) ⁽¹⁾	< 1	< 1	< 1
Coliformes a 30-35°C (NMP.mL ⁻¹) ⁽²⁾	< 0,3	< 0,3	< 0,3
Coliformes a 45°C (NMP.mL ⁻¹) ⁽²⁾	< 0,3	< 0,3	< 0,3
<i>Salmonella</i> sp (em 25 mL)	Ausente	Ausente	Ausente
Estafilococos coagulase positivo (log UFC.mL ⁻¹) ⁽¹⁾	< 1	< 1	< 1
Bolores e leveduras (log UFC.mL ⁻¹) ⁽¹⁾	< 1	< 1	< 1

⁽¹⁾UFC.mL⁻¹: Unidade formadora de colônias por mililitro.

⁽²⁾NMP.mL⁻¹: Número mais provável por mililitro.

De acordo com a Instrução Normativa 51¹⁸, o leite pasteurizado desnatado tipo A deve apresentar, entre outros requisitos físico-químicos, teor de gordura máximo de 0,5 g/100g e acidez de 0,14 a 0,18 g ácido láctico/100mL (14 a 18°D). Os LDPLHM obtidos (tabela 2) atenderam aos critérios estabelecidos pela legislação¹⁸. Os leites desnatados utilizados nesse experimento, antes da operação de microfiltração, apresentavam teor de gordura de 0,5%. Porém, como a microfiltração promove a remoção física da gordura do leite, os leites desnatados pasteurizados microfiltrados apresentaram ausência de gordura.

Tabela 2 - Composição físico-química média (n=3 processamentos) apresentada pelos leites desnatados pasteurizados lactose-hidrolisados microfiltrados, com 1 dia de estocagem.

Parâmetros	Valores
Densidade (g/mL)	1,034±0,001
pH	6,72±0,09
Acidez titulável (°D)	15,52±0,42
Extrato seco total (%)	8,34±0,11
Lactose (%)	<0,2
Cinzas (%)	0,73±0,01
Gordura (%)	0±0
Proteína (%)	2,94±0,09

Com relação aos valores de pH, extrato seco total, proteínas e de sais, a legislação não determina quais as faixas de valores adequadas destes parâmetros para o leite pasteurizado desnatado. Porém, em revisão sobre microfiltração de leite¹⁹, os dados de pH e cinzas apresentados para leite desnatado microfiltrado são similares aos obtidos nesse estudo e os de proteína e extrato seco total, superiores.

Quanto à lactose, como o leite desnatado pasteurizado utilizado nessa pesquisa possuía um teor de lactose de 5,0% (dado fornecido pela empresa fornecedora do leite - Salute), os leites tratados com lactase apresentaram o grau de hidrólise desejado, ou seja, superior a 90%.

3.2 Caracterização físico-química e microbiológica dos LDPLHM durante a estocagem refrigerada

Os resultados (n=3 processamentos) das avaliações físico-químicas dos leites LDPLHM, durante estocagem refrigerada a 5°C, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização físico-química média (n=3 processamentos) das amostras de leite desnatado pasteurizado lactose-hidrolisado microfiltrado, durante estocagem a 5°C.

Estocagem (dias)	pH	Acidez Titulável (°D)	CN/PV(%) ⁽¹⁾	IP(%) ⁽²⁾
1	6,72 ^{AB}	15,52 ^{AB}	77,10 ^A	0
5	6,74 ^{AB}	15,36 ^{AB}	75,98 ^A	1,12
10	6,78 ^A	15,07 ^A	75,10 ^{AB}	2,00
15	6,76 ^A	16,05 ^{ABC}	73,73 ^{AB}	3,37
20	6,76 ^A	15,32 ^{AB}	71,35 ^{ABC}	5,75
25	6,57 ^B	18,33 ^C	69,92 ^{ABC}	7,18
30	6,64 ^{AB}	18,00 ^{BC}	67,61 ^{ABC}	9,49
35	6,64 ^{AB}	17,02 ^{ABC}	65,74 ^{BC}	11,36
40	6,66 ^{AB}	18,00 ^{BC}	63,68 ^C	13,42

⁽¹⁾CN/PV(%) = caseína como porcentagem de proteína verdadeira. IP(%)² = índice de proteólise, correspondendo à diminuição da caseína como porcentagem de proteína verdadeira. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05).

Considerando-se que neste projeto de pesquisa foi adotado o critério de que a vida de prateleira do leite LDPLHM atingiria o seu fim quando o mesmo apresentasse valores de acidez fora dos limites da legislação e/ou índice de proteólise igual ou superior a 4,76%, as amostras estocadas a 5°C apresentaram durabilidade média (n=3 processamentos) entre 15-20 dias (tabela 3). Após 20 dias de estocagem, embora as amostras apresentassem uma acidez média de 15,32°D, em termos de IP as mesmas já tinham atingindo valor superior a 4,76%.

No Brasil, de modo geral, leites pasteurizados tipo A tendem a apresentar vida de prateleira de 5 a 8 dias. Assim, a microfiltração, em combinação com o tratamento de pasteurização HTST (*high temperature short time*), pode ser utilizada para aumentar a vida útil deste leite refrigerado.

No Canadá e em países do norte europeu, leites com teor normal de lactose, submetidos aos processos de microfiltração e pasteurização HTST (72°C /15 seg.), estão disponíveis comercialmente e apresentam vida útil média de 35 dias a 6°C²⁰. Existem também alguns trabalhos de pesquisa⁶ que relatam que amostras de leite desnatado microfiltrado e pasteurizado, armazenadas a temperatura de 6,1°C, apresentaram vida útil de 32 dias, período a partir do qual o leite atingia índice de proteólise indesejável (IP de 4,76%).

Os leites comercializados no Canadá e em países do norte europeu, bem como os obtidos por autores⁶, apresentam vida de prateleira maior do que a obtida para os leites deste trabalho. Um dos motivos para essa menor vida de prateleira obtida para os LDPLHM pode estar relacionado ao fato do produto não ter sido envasado em equipamento com enchimento asséptico.

Os resultados das análises microbiológicas (tabela 4) mostram que a população de microrganismos aeróbios mesófilos ficou acima da permitida pela Instrução Normativa nº51¹⁸ apenas no 25º dia de estocagem refrigerada, e que os coliformes a 30-35°C e a 45°C não foram detectados até o final do período de estocagem estudado (40 dias). Portanto, estes dados confirmam resultados de pesquisas já realizadas em leites pasteurizados microfiltrados^{6,8}, segundo os quais a vida de prateleira desse produto costuma ser limitada primeiramente devido à atividade proteolítica e, posteriormente, por crescimento microbiano.

Tabela 4 - Resultados das análises microbiológicas do segundo processamento de leite desnatado pasteurizado lactose hidrolisado microfiltrado.

Estocagem (dias)	Microrganismos		
	Aeróbios mesófilos totais (log UFC.mL ⁻¹) ⁽¹⁾	Coliformes a 30-35°C (NMP.mL ⁻¹) ⁽²⁾	Coliformes a 45°C (NMP.mL ⁻¹) ⁽²⁾
5	<1	<0,3	<0,3
10	<1	<0,3	<0,3
15	<1	<0,3	<0,3
20	<1	<0,3	<0,3
25	6,74	<0,3	<0,3
30	1,94	<0,3	<0,3
35	3,94	<0,3	<0,3
40	4,85	<0,3	<0,3

⁽¹⁾UFC.mL⁻¹: Unidade formadora de colônias por mililitro. ⁽²⁾NMP.mL⁻¹: Número mais provável por mililitro.

4 Conclusões

Os leites desnatados pasteurizados lactose hidrolisados microfiltrados deste estudo têm vida de prateleira de 15 a 20 dias, quando estocados a 5°C, adotando-se como critérios para determinação desse período de vida útil parâmetros microbiológicos e físico-químicos definidos pela legislação (IN 51) e por estudos científicos.

Agradecimentos

À FAPESP (apoio financeiro a Projeto) e CNPq (bolsas PIBIC)

Referências

1. Téó CRSA. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. Arq. Ciência Saúde UNIPAR. 2002;6(3):135-9.
2. Mahan LH, Escott-Stump S. Krause's food, nutrition & diet

- therapy. São Paulo: Roca; 2004.
3. Suarez FL, Savaiano DA. Diet, genetics, and lactose intolerance. *Food Technology*. 1997;51(3):74-6.
 4. Miller GD, Jarvis JK, McBean LD. The importance of meeting calcium needs with foods. *Journal of the American College of Nutrition*. 2001;20(2):168-85.
 5. Folha de São Paulo. Leite desnatado reduz os riscos de hipertensão [Internet]. [acesso em 12 jun. 2008]. Disponível em: URL: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/equilibrio/noticias/ult263u376770.shtml>.
 6. Elwell MW, Barbano DM. Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*. 2006; 89:E20-30.
 7. Vieira MC, Cavichiolo JR, Gasparino Filho JF, Van Dender AGF, Spadoti LM, Silva AT. Análise de investimentos e custos: leite fluido UHT versus leite microfiltrado. Congresso Internacional do Leite: Anais do 6º Congresso Internacional do Leite; 2007.
 8. Santos MV, Ma Y, Caplan Z, Barbano DM. Sensory threshold of flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*. 2003;86:1601-7.
 9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa DAS nº 22, de 14 de abril de 2003. Portaria Ministerial, nº 574, de 8 de Dezembro de 1998. In: Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília ; 2003.
 10. Ramet JP, Novak G, Evers PA, Nijpels HH. Applications à la mesure de l'hydrolyse enzymatique du lactose. *Lait*. 1979;581-582:47-55.
 11. Burger E, Feinberg M. Determination of mono- and disaccharides in foods by interlaboratory study: quantification of bias components for liquid chromatography. *Journal of AOAC International*. 1992;75(3):443-64.
 12. American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. 17th ed. Washington: American Public Health Association; 2004.
 13. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. Brasília: MS; 2005.
 14. International Dairy Federation. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. Bruxelas: FIL/IDF; 1982.
 15. Horwitz W. Official methods of analysis of AOAC international. AOAC; 1975.
 16. Aschaffenburg R, Drewry J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. International Dairy Congress: Proceedings of the 15th International Dairy Congress; 1959; London. London: International Dairy Federation; 1959.
 17. AOAC – Association of analytical chemistry. Official methods of analysis of AOAC international. Washington:AOAC; 1995.
 18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. Diário Oficial da União, Brasília. 2002. S.1, p.13.
 19. Saboya LV, Maubois JL. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait*. 2000;80:541-53.
 20. Saboya LV. Lise de *Lactococcus sp* e proteólise em queijos fabricados com ultrafiltração e microfiltração [tese]. Piracicaba: ESALQ/USP; 2002.

