

Aplicação de tanase parcialmente purificada em teste de digestão *in vitro* de animais monogástricos**Application of partially purified tannase *in vitro* testing of monogastric animals digestion**

DOI: 10.34188/bjaerv3n3-035

Recebimento dos originais: 20/05/2020

Aceitação para publicação: 20/06/2020

Genésio José da Silva Neto

Discente do Curso Técnico em Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: gjsacademico.neto@gmail.com

Thyago Moreira Leal

Discente e do Curso de Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: thyagoleal@hotmail.com

Jessica Rayanne Gomes de Oliveira

Discente do Curso de Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: jessycarayanne22@hotmail.com

Marcelo Rodrigues Figueira de Mello

Doutor de Fitopatologia pela Universidade Federal Rual de Pernambuco

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: marcelomello@barreiros.ifpe.edu.br

Tonny Cley Campos Leite

Doutor em Inovação Terapêutica pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: toycly@gmail.com

Amanda Reges de Sena

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana

Instituição: Laboratório de Bromatologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco, Campus Barreiros

Endereço: Fazenda Sapé, S.N. – Zona Rural – Barreiros/PE – CEP: 55560-000

E-mail: amandareges@gmail.com

RESUMO

Tanases são enzimas que hidrolisam as moléculas de taninos hidrolisáveis. Sua utilização, em alimentos, contribui para remover os efeitos indesejáveis dos taninos. O objetivo do presente trabalho foi produzir e aplicar tanase de *Aspergillus niger* URM 7131 em teste de digestão *in vitro* de animais monogástricos. A produção enzimática ocorreu sob fermentação submersa. Após este período o extrato enzimático bruto passou por uma purificação parcial por meio de membranas de ultrafiltração. Foi avaliada a atividade enzimática e conteúdo proteico. Após purificação parcial verificou-se o efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática, e então procedeu-se a aplicação no teste de digestão *in vitro*. Na purificação parcial foi possível obter um fator de purificação de 3,8. A tanase apresentou um ótimo a 40°C, foi estável entre 30 a 60 °C, retendo entre 67,1 a 100%. Teve sua atividade ótima no pH 4, sendo também mais estável neste pH após 180 minutos. A tanase reteve 159,3% após a simulação total digestão *in vitro*. Esses resultados sugerem que a enzima pode ser empregada como aditivo de rações animais. Verifica-se a necessidade de novos estudos *in vivo* visando verificar a eficiência catalítica da tanase obtida de *A. niger* URM7131.

Palavras-chave: Aditivo de rações, *Aspergillus niger*, Tanino Acil Hidrolase, Ultrafiltração.

ABSTRACT

Tannases are enzymes that hydrolyze hydrolyzable tannin molecules. Its use in food helps to remove the undesirable effects of tannins. The objective of the present work was to produce and apply *Aspergillus niger* URM 7131 tannase in an *in vitro* test of monogastric animals digestion. The enzymatic production occurred under submerged fermentation. After this period, the crude enzyme extract underwent partial purification by means of ultrafiltration membranes. The enzymatic activity and protein content were evaluated. After partial purification, the effect of pH and temperature on enzyme activity and stability was verified, and then the *in vitro* digestion test was applied. In partial purification it was possible to obtain a purification factor of 3.8. The tannase showed an optimum at 40°C, was stable between 30 to 60 °C, retaining between 67.1 to 100%. It had its optimal activity at pH 4, being also more stable at this pH after 180 minutes. Tannase retained 159.34% after total simulation *in vitro* digestion. These results suggest that the enzyme can be used as an additive to animal feed. There is a need for further *in vivo* studies to verify the catalytic efficiency of the tannase obtained from *A. niger* URM7131.

Keywords: *Aspergillus niger*, Feed additive, Tannin Acyl Hidrolase, Ultrafiltration

1 INTRODUÇÃO

Tanino acil hidrolase (E.C. 3.1.1.20), conhecida como tanase, é produzida na presença de ácido tânico, tanino hidrolisável, por: fungos filamentosos, bactérias e leveduras (AGUILAR et al., 1999). Essa enzima é amplamente utilizada na indústria, podendo citar as de alimentos, sucos, cervejarias, farmacêutica e química. Uma das principais utilizações da mesma é para produção de

ácido gálico, chás instantâneos, na estabilização da cor do vinho, refrigerantes a base de café, no tratamento de couro, remoção de adstringência em produtos vegetais e para tratamento de efluentes na indústria de couros (LEKHA; LONSANE, 1997). É uma enzima extracelular, pode ser induzida, ela hidrolisa os ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis (BANERJEE et al., 2001).

A aplicação de enzimas em rações para dietas de animais vem crescendo cada vez mais nos últimos anos. Segundo Bate-Smith e Rasper (1969), várias plantas utilizadas na dieta animal apresentam um teor considerável de taninos, podendo incomodar. Estes compostos ao complexar-se com proteínas provocam efeitos onde chegam a reduzir o valor nutricional da dieta tais como: digestibilidade proteica e inibição de enzimas digestivas (BHAT et al., 1998). A utilização da tanase em rações animais contendo taninos pode trazer alguns efeitos benéficos atuando na remoção desses compostos. Ela pode ser usada a partir do contato direto do extrato enzimático com o devido material a ser tratado ou através do desenvolvimento de linhagens de fungos que produzem tanase nos materiais com alto teor de taninos, degradando-a e assim inibindo a formação de complexos com proteínas (AGUILAR; GUTIERREZ-SANCHEZ, 2001).

Contudo, a atividade das enzimas em suas diversas aplicações pode ser afetada por alguns fatores: temperatura, pH, e pela presença de inibidores (RANA et al., 2003). Tais fatores influenciam na estabilidade enzimática quando se tem interesse em aplicá-la em larga escala. Segundo Aguilar et al. (2007) devido à falta de conhecimento sobre suas propriedades e condições ótimas de produção, seu uso tornou-se demasiadamente limitado.

A fim de reduzir custos e viabilizar o uso de tanase, faz-se necessária à realização de estudos em diversas áreas de pesquisa a respeito da produção de tanase fúngica em escala industrial, além de um completo entendimento a respeito da regulação, capacidade catalítica, especificidade e aspectos de otimização desta produção em escala industrial (BATTESTIN et al., 2004). A partir do exposto o presente trabalho teve como objetivo purificar, caracterizar parcialmente e aplicar tanase obtida de *Aspergillus niger* URM7131.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O plano de trabalho foi realizado nos laboratórios de Bromatologia e Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia/Campus Barreiros. O fungo encontra-se incorporado à Coleção de Culturas Micoteca URM, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco e no Campus Barreiros, preservado em água destilada esterilizada em frascos de penicilina (CASTELLANI, 1939).

2.1 PREPARO DO INÓCULO

Para ativá-lo foi feito o repique em meio BDA, pH 6,8 e incubado em B.O.D a 28 °C durante 10 dias.

2.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA

A produção da enzima por *Aspergillus niger* URM 7131 foi realizada utilizando ácido tânico como única fonte de carbono. O meio de fermentação foi constituído por (g/L): NaNO₃ (6), KCl (1), MgSO₄·7H₂O (0,5), FeSO₄·7H₂O (0,01), K₂HPO₄·3H₂O (1), ácido tânico (1), extrato de levedura (0,6 %). O pH inicial, o tempo de fermentação e temperatura de incubação, do processo fermentativo, foram 6, 72h e 26°C, respectivamente. A mistura foi autoclavada a 121 °C/1 atm por 15 min. Após o arrefecimento dos frascos à temperatura ambiente, o conteúdo inoculado com 1x10⁶ esporos/mL e acrescentado o ácido tânico (após passar em membrana de 0,45 µm). Após fermentação, o caldo fermentativo foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato enzimático bruto) foi congelado e utilizado para ensaios posteriores. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONTEÚDO PROTÉICO

A atividade da tanase foi estimada pelo método de Pinto et al. (2006), utilizando rodanina etanólica e ácido tânico como substrato. A unidade de atividade tanásica (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto nas condições de ensaio.

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL

2.4.1 Ultrafiltração em membranas (30 e 100KDa)

O extrato enzimático bruto (10 mL) foi adicionado às membranas, separadamente, sendo posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 60 minutos, 4°C, e em seguida foram coletados o retido e o permeado de cada membrana. Estes foram, separadamente, reconstituídos ao volume inicial (10 mL). Logo após foi realizado os testes, em ambos, de atividade enzimática e proteína total como descrito anteriormente.

2.5 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

2.5.1 Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática

Para determinar a temperatura ótima, a atividade foi testada incubando o meio reacional (enzima e substrato) em temperaturas que variarão de 30 a 90 °C. O pH ótimo foi determinado a 30 °C pela incubação da enzima e substrato a diferentes valores de pH (3,0 a 9,0). A atividade foi estimada como descrito anteriormente.

2.5.2 Efeito da temperatura e pH na estabilidade enzimática

Foi avaliado o efeito do pH (3,0 a 9,0) e temperatura (30 a 90 °C), na estabilidade enzimática após 180 minutos. A cada intervalo de tempo (60 min) alíquotas foram retiradas e a atividade residual foi medida. A atividade no tempo 0 minutos foi considerada 100%.

2.6 ENSAIO DE SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO *IN VITRO* DE ANIMAIS MONOGÁSTRICOS

A simulação seguiu a metodologia proposta por Boyce e Walsh (2007) modificada por Gomes et al. (2014). O primeiro teste foi a simulação da digestão gástrica onde o extrato enzimático bruto foi posto em contato com pepsina. O meio reacional foi incubado a 39 °C, por 2 horas a 150 rpm. No segundo ensaio o extrato enzimático foi posto em contato com pancreatina e extrato de bile para simular a digestão entérica. A incubação foi a mesma do teste anterior, no entanto, por 4 horas. No terceiro teste foi adicionada tripsina. No quarto foi simulada a digestão total (6 h). Cada teste teve seus respectivos controles (tanase parcialmente purificada e água) e brancos (Enzimas digestivas + água). A atividade residual foi encontrada segundo a equação abaixo:

$$AC - 100\% \quad \text{Eq. (1)}$$

$$(AE - AB) - AR$$

Onde: **AC** (Atividade do controle); **AE** (Atividade da enzima tanase); **AR** (atividade residual); **AB** (Atividade do branco).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados passaram por uma análise de comparação de médias por meio do programa Sisvar (Sistema de Análise de Variância) a um nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

3 RESULTADOS EDISCUSSÃO

Várias estratégias podem ser utilizadas para a concentração ou purificação de enzimas após a extração da biomassa. Visando o aumento da atividade específica da preparação enzimática, a tanase deve ser concentrada. Isto pode ser obtido por meio de precipitação, com sal ou solventes, e ultrafiltração, seguida de cromatografia de exclusão molecular ou troca iônica (LEKHA; LONSANE, 1994). A partir da Tabela 1 pode-se verificar que o processo de ultrafiltração foi eficiente na concentração da tanase, onde pode ser obtida atividade específicas entre 4,9 a 13,02 U/mg. Após utilizar a membrana de 30 KDa, em seu retido, foi possível obter uma enzima 3,8 mais pura que o extrato bruto com um rendimento de 77,3%.

A partir da Tabela1 pode-se também sugerir que no extrato enzimático obtido de *Aspergillus niger* URM 7131 podem ser encontradas várias subunidades de pesos moleculares diferentes. Isto pode ser verificado pelos valores obtidos das atividades volumétricas. No entanto, a maior concentração (maior atividade específica e fator de purificação) foi encontrada no retido da membrana de 30 KDa, isto é, a maioria das subunidades podem ter 30 KDa ou menor.

Tabela 1: Etapas da purificação parcial de tanase obtida de *A. niger* URM 7131

Ensaio	AV (U/mL)	PT (mg/mL)	AE (U/mg)	FP
EB	2,05	0,6	3,5	1,0
Retido (30 KDa)	1,6	0,1	13,02	3,8
Permeado (30 KDa)	2,6	0,5	4,9	1,4
Retido (100 KDa)	1,2	0,2	7,4	2,1
Permeado (100 KDa)	2,6	0,4	6,4	1,9

AV – Atividade Volumétrica; PT – Proteína total; AE – Atividade Específica; FP – Fator de Purificação.

Mata-Gómez et al. (2009) após purificar tanase de *Aspergillus niger* GH1 por meio de ultrafiltração (1 KDa), cromatografia de troca aniônica e filtração em gel, obtiveram um fator de purificação de 46 e rendimento de 0,3%. Segundo os autores foram obtidos três bandas de 50, 75 e 100 KDa, sugerindo que a enzima seja composta de três subunidades. Nandi e Chatterjee (2016) purificaram parcialmente tanase obtida de *A. niger* MTCC 2425. Os pesquisadores encontraram fatores de purificação ao redor de 1,4 e 6,1 após utilizarem precipitação com sulfato de amônio a 75% seguida de diálise e cromatografia de troca iônica, respectivamente. Vale ressaltar que preparações enzimáticas parcialmente purificadas são suficientes para diversas aplicações industriais e etapas de purificação desnecessárias devem ser evitadas, pois são dispendiosas em termos de equipamento, mão-de-obra e devido à perda de atividade enzimática (UHLIG, 1998).

A temperatura e pH afetam vários processos metabólicos como desnaturação proteica, inibição enzimática, promoção ou inibição da produção de um metabólito particular, morte celular,

etc. Neste trabalho os ensaios enzimáticos foram realizados em várias temperaturas que variaram de 30 a 90 °C. A maior atividade enzimática foi encontrada na temperatura de 40 °C (100%) (Figura 1) declinando acima deste valor chegando a 15,8 e 2,2% em 80 e 90 °C, respectivamente.

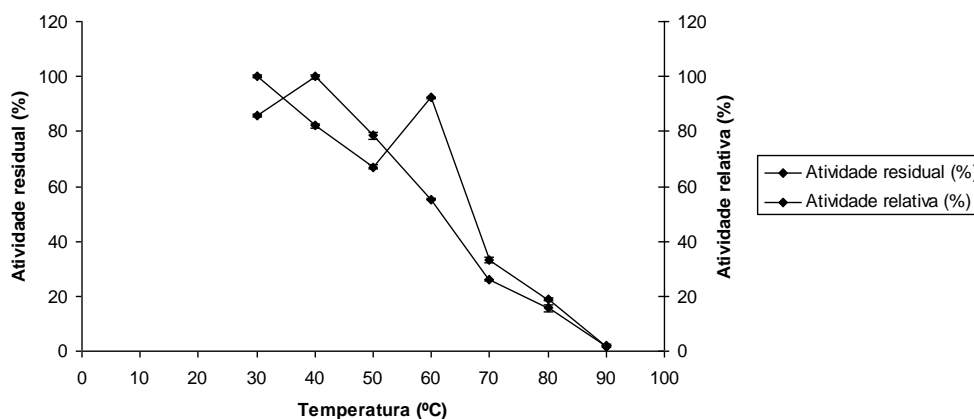


Figura 1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade (180 minutos) da tanase parcialmente purificada obtida de *A. niger* URM 7131. Todas as reações foram realizadas em tampão citrato de sódio a 0,05 g mol⁻¹ (pH 5,0) por 5 min e 180 min para a temperatura ótima e termoestabilidade, respectivamente. A temperatura variou entre 30-90°C.

Trabalho similar foi encontrado por Lal e Gardner (2012) ao purificar tanase obtida de *Aspergillus niger*. A enzima apresentou maior atividade a 35 °C. Cavalcanti et al. (2017) ao avaliarem a produção de tanase por *A. niger* ANG 18 e *A. fumigatus* CAS21 encontraram, para ambos os fungos, uma temperatura ótima de 30 °C. Em relação à termoestabilidade verificou-se que a tanase de *A. niger* URM 7131 foi altamente estável entre 30 a 60 °C, retendo entre 67,08 a 100% de sua atividade inicial após 180 minutos de incubação. O perfil da estabilidade térmica da tanase produzida por *Penicillium notatum* NCIM 923 indicou que a 40 °C a enzima reteve mais que 95% de atividade residual (GAYEM e GHOSH, 2013).

As tanases fúngicas, em geral, são enzimas ácidas. A tanase parcialmente purificada de *Aspergillus niger* URM 7131 teve uma máxima atividade no pH 4 (100%) e um pico secundário no pH neutro (62,4%) (Figura 2). Observações similares foram reportadas para tanase obtida de *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-8281 também apresentou dois picos de atividades (pH 4,5 e 8,5) e estabilidade entre 4 (99,6%) e 6 (83%) por 30 minutos (MAHAMOUD et al., 2018).

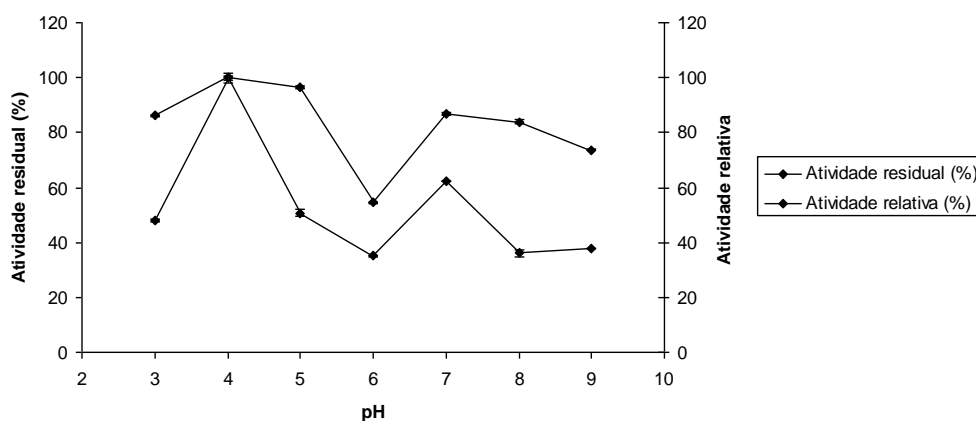


Figura 2. Efeito do pH na atividade e estabilidade (180 minutos) da tanase parcialmente purificada obtida de *A. niger* URM 7131. Todas as reações foram realizadas em tampão apropriado a 30°C por 5 min e 180 min para o pH ótimo e estabilidade ao pH, respectivamente. Os valores de pH foram seguidos os seguintes tampões: citrato de sódio (3,0-6,0), fosfato (7,0-8,0) e Tris-HCl (9,0).

Terceiro maior produtor mundial de produtos para alimentação animal, atrás de China e Estados Unidos, o Brasil ainda importa a maioria dos aditivos utilizados pela indústria, como vitaminas, aminoácidos, enzimas e promotores de crescimento (RIBEIRO, 2013). Os aditivos para alimentação animal representou US\$ 15,1 bilhões em 2012, algo próximo a 6% do valor total da produção de ração. As hidrolases, enzimas que catalisam a quebra dos substratos na presença de moléculas de água, representam 75% das enzimas industriais (DELMASCHIO, 2018). Estimativas mostraram que esse mercado alcançou cerca US\$ 18,7 bilhões em 2016 (SÓRIO, 2012).

As enzimas exógenas são utilizadas para diminuir os fatores anti-nutricionais e aumentar a digestibilidade de nutriente e melhorar a sua utilização. Esses aditivos alimentares têm sido incorporados aos alimentos dos animais não só com o propósito de melhorar o seu desempenho, mas também a sua rentabilidade. A enzima pode ser adicionada ao alimento seco e só é ativada no trato digestivo quando misturada aos fluidos digestivos e sob a temperatura do organismo (ROTTER, 1990). Por isso a necessidade do teste preliminar de digestão in vitro, para verificar se a enzima a ser utilizada terá estabilidade durante o processo digestivo. Trabalhos recentes têm demonstrado respostas positivas quanto a digestibilidade de nutrientes e ao desempenho de suínos e aves alimentados com rações à base de milho e soja, quando estas foram suplementadas com enzimas, como carboidrases, proteases, pectinases e α -galactosidase, portanto, o uso de enzimas na alimentação animal pode aumentar a eficiência de produção. Além do benefício da redução do custo da ração, a melhora do desempenho produtivo dos animais, quando o nutricionista utiliza enzimas, trará inevitavelmente para indústria uma redução no custo do quilo de proteína produzida (FIREMAN, 2013).

Foi observado (Tabela 2) que a tanase não perdeu atividade após 6 h durante a simulação do trato intestinal de animais monogástricos.

Tabela 2: Atividade residual da tanase produzida por *A. niger* URM 7131 sob simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal de animais monogástricos

Ensaio	Atividade residual(%)
Controle ^{1,2,3}	100 d
¹ Pepsina +HCl(2h)	166,8 c
² Pancreatina + Extrato de Bile(4h)	187,04 b
³ Tripsina + Ácido taurocólico(4h)	209,6 a
Controle ⁴	100 d
⁴ Digestãototal(6h)	159,34 c

Atividade enzimática correspondente a 100% (controle^{1,2,3}) = $13,3 \pm 0,1$. Atividade enzimática correspondente a 100% (controle⁴) = $14,7 \pm 0,4$. Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Verificou-se que todos os ensaios apresentaram atividades residuais estatisticamente superiores aos seus respectivos controles. Além disso, alguns pesquisadores afirmam que a presença de componentes digestivos *in vivo* podem melhorar o desempenho da enzima (BOYCE; WALSH, 2007).

Neste sentido, os resultados sugerem que a tanase obtida do *A. niger* URM 7131 pode ser utilizada como aditivo de rações dos animais supracitados.

Na literatura estudada foram encontrados apenas dois trabalhos tratando da simulação da digestão *in vitro* utilizando tanase. De acordo com o trabalho desenvolvido por Sena et al. (2014), utilizando tanase obtida de *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114, os autores obtiveram como resultado 87,3% de atividade residual após 6 h de simulação da digestão. Também de acordo com Sena et al. (2018), utilizando *A. tamarii* URM 7115, a enzima reteve 124% da sua atividade inicial. A tanase obtida do *A. niger* URM 7131 reteve 159,3% da sua atividade inicial, sendo superior aos trabalhos supracitados.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como finalidade produzir e purificar parcialmente a tanase utilizando *Aspergillus niger* URM 7131 como fonte microbiana. Ademais, aplicar no teste de simulação da digestão *in vitro* de animais monogástrico. Ficou evidente que este fungo pode ser um potencial produtor de tanase. A ultrafiltração foi eficaz na concentração da enzima alvo proporcionando um fator de purificação ao redor de 3,8. A tanase apresentou atividade ótima a 40 °C e pH 4. Foi possível observar que a enzima produzida apresentou atividade em toda faixa de pH estudado e estabilidade a este parâmetro após 180 minutos, retendo entre 54,4 a 100% de sua atividade residual. A mesma também se mostrou termoestável durante 3 horas, garantindo seu uso

nos mais variados processos industriais, tanto para a redução do teor de taninos durante o processamento de alimentos quanto para a produção de ácido gálico a partir da hidrólise do ácido tânico. Em relação ao teste de digestão *in vitro* o estudo contribuiu para a identificação de espécie microbiana produtora de tanase com potencial aplicação como aditivo de rações de animais monogástricos. No entanto, verifica-se a necessidade de novos estudos *in vivo* visando verificar a eficiência catalítica da tanase obtida de *A. niger* URM 7131.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, *Campus* Barreiros, pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SANCHÉZ, G. Review sources, properties, application and potential uses of the tannin acyl hydrolase. **Food science and technology International**, London, v.7, p.373-382, 2001.
- AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA, E. A comparison of methods to determine Tannin Acyl Hydrolase Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, p. 355-361, 1999.
- AGUILAR, C. N., RODRÍGUEZ, R., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G., AUGUR, C., FAVELATORRES, E., PRADO-BARRAGAN, L. A., RAMÍREZ-CORONEL, A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Microbial Tannases: advances and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 47–59, 2007.
- BANERJEE, D.; MONDAL, K.C.; PATI, B.R. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. **Journal Basic Microbiology**, 41, p. 313-318. 2001.
- BATE-SMITH, E. C., RASPER, V. Tannins of grain sorghum: luteoforal (leucoluteolinidin), 3',4,4',5,7-pentahydroxyflavan. **Food Science**, v. 34, p. 203-209, 1969.
- BATTESTIN, V, MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1832-1837, 2007.
- BHAT, T. K.; SINGH, B.; SHARMA, O. P. Microbial degradation of tannins: a current perspective. **Biodegradation**, v. 9, p. 343-357, 1998.
- BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **J. Biotechnol.**, v. 132, p. 82-87, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVALCANTI, R. M. R.; ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES. Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 5, p. 1-9, 2017.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p.270-276, 1939.

DELMASCHIO, I. B. Enzimas na alimentação de animais monogástricos - Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 2, p. 06-20, 2018.

EL-TANASH, A. B.; SHERIEF, A. A.; NOUR, A. Optimization the hydrolysis process of tannic acid for gallic acid production by tannase of *Aspergillus awamori* using response surface methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p.9-17, 2012.

FIREMAN, F. **Enzimas na Nutrição Animal**. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/enzimas-nutricao-animal-t1645/141-p0.htm>>. Acesso em: 04 jul.2018.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

LAL, D.; GARDNER, J.J. Production, Characterization and purification of tannase from *Aspergillus niger*. **Euro. J. Exp. Bio.** v. 5, p. 1430-1438, 2012.

GAYEM, S.; GHOSH, U. Purification and characterization of tannin acyl hydrolase produced by mixed solid state fermentation of wheat bran and marigold flower by *Penicillium notatum* NCIM 923. **Bio Med Res. Int.**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. **Process Biochemistry**, v. 29, n. 6, p. 497-503, 1994.

LEKHA, P. K.; LONSANE, B. K. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 215-260, 1997.

MAHMOUD, A. E.; FATHY, S. A.; RASHAD, M. M.; EZZ, M. K. MOHAMMED, A. T. Purification and characterization of a novel tannase produced by *Kluyveromyces marxianus* using olive pomace as solid support, and its promising role in gallic acid production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2342-2350, 2018.

MATA-GOMEZ, M.; RODRIGUEZ, L. V.; RAMOS, E.L.; RENOVATO, J.; CRUZ-HERNANDEZ, M. A.; RODRIGUEZ, R.; CONTRERAS, J.; AGUILAR, C. N. A novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 987-996, 2009.

NANDI, S.; CHATTERJEE, A. Extraction, partial purification and application of tannase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 1, p. 20-23, 2016.

PINTO, G.A.S., COURI, S., GONÇALVES, E.B. Replacement of methanol by ethanol on gallic acid determination by rhodanine and its impacts on the tannase assay. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, p. 1560-1568, 2006.

RANA, D. S. et al. Stability and kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 149-155, 2003.

RIBEIRO, J. **Estudo indica mercado para rações**. Disponível em: <<http://www.sebraesp.com.br/index.php/22-noticias/industria/7440-estudo-indica-mercado-para-racoes>>. Acesso em: 04 jul. 2018.

ROTTER, B. A. The future of crude enzyme supplements in pig nutrition. **Pig News Information**, v. 11, p. 15-17, 1990.

SENA, A. R.; LEITE, T. C. C.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; SILVA, A. C.; SOUZA, C. S.; VAZ, A. F. M.; MOREIRA, K. A.; ASSIS, S. A. Kinetic, thermodynamic parameters and in vitro digestion of tannase from *Aspergillus tamarii* URM 7115. **Chemical Engineering Communications**, v. 205, p. 1415-1431, 2018.

SENA, A. R., SANTOS, A. C. B., GOUVEIA, M. J., MELLO, M. R. F., LEITE, T. C. C., MOREIRA, K. A., AND ASSIS, S. A. Production, Characterization and application of a thermostable tannase from *Pestalotiopsis guepinii* URM 7114. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 459-467, 2014.

SÓRIO, A. **Estudo da viabilidade técnica e econômica destinado à implantação do Parque produtivo nacional de aditivos da indústria de alimentação de animais de produção**. Passo Fundo: Méritos, 2012. 300 p.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p.37-202.