

# USO DE LA AMILASA TERMOESTABLE DE *Bacillus licheniformis* EN LA DIGESTIBILIDAD *in vitro* DEL ALMIDÓN DE SORGO Y MAÍZ

## USE OF THERMOSTABLE AMYLASE FROM *Bacillus licheniformis* ON *in vitro* STARCH DIGESTION OF SORGHUM AND CORN

Rolando Rojo-Rubio, Germán David Mendoza-Martínez y María Magdalena Crosby-Galván

Especialidad de Ganadería, IREGEP. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México (rolandorojo@hotmail.com, rrolando@colpos.colpos.mx)

### RESUMEN

Varias enzimas celulolíticas se han usado para incrementar la digestión ruminal de la fibra y mejorar la producción en rumiantes. Sin embargo, se ha dado poca atención a las enzimas amilolíticas como un tratamiento a los granos, a pesar de que la productividad del ganado puede mejorar con el uso de mezclas de enzimas externas, incluyendo amilasas y celulasas. Así, se incubó sorgo, sorgo rolado con vapor y maíz (500 mg de grano), con fluido ruminal para estudiar el efecto de la adición de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (400 µL) en la digestibilidad *in vitro* del almidón a las 12 h de fermentación. La incubación (bloque) fue repetida tres veces y los resultados se analizaron bajo un diseño de Bloques Completos al Azar Generalizado, utilizando la interacción bloque por tratamiento para estimar el error experimental. No se detectó interacción entre tipo de grano y enzima. La adición de la enzima termoestable incrementó ( $p < 0.0001$ ) la digestión *in vitro* del almidón (59.9 vs. 38.5%). La digestión *in vitro* promedio del almidón ( $p < 0.0001$ ) fue más baja en el sorgo (30.42%), intermedia en el sorgo rolado con vapor (50.72%), y más alta en el maíz (66.48%). La adición de la amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* incrementó la digestión *in vitro* del almidón del sorgo y maíz; por lo tanto, esta enzima podría mejorar la digestión *in vivo* del almidón y la eficiencia alimenticia de dietas basadas en granos con tasas bajas e intermedias de fermentación.

**Palabras clave:** Almidón, digestión, enzimas, granos.

### INTRODUCCIÓN

La digestión ruminal del almidón es uno de los factores más importantes que determinan el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas altas en granos (Britton y Stock, 1986). Así, se han desarrollado procesos (rolado en seco, rolado con vapor) para incrementar la tasa de digestión del almidón y el valor energético de los granos (Owens *et al.*, 1997).

El uso de enzimas amilolíticas exógenas ha recibido poca atención como tratamiento para los granos o como

### ABSTRACT

Several cellulolytic enzymes have been used to increase ruminal fiber digestion and to improve ruminant production. However, amylolytic enzymes have received little attention as a grain treatment, even when cattle performance can be improved with a mixture of external enzymes including amylases and cellulases. Thus, sorghum, steam-rolled sorghum and corn (500 mg of grain), were incubated with ruminal fluid to study the effect of adding alpha-amylase (400 µL) of *Bacillus licheniformis* on *in vitro* starch digestion at 12 h of fermentation. The incubation (block) was repeated three times and data were analyzed under a Generalized Complete Randomized Block Design, using the interaction block by treatment as an estimate of the experimental error. No interaction between grain source and enzyme was found. The addition of thermostable enzyme increased ( $p < 0.0001$ ) the *in vitro* starch digestion (59.9 vs. 38.5%). Average *in vitro* starch digestion was lowest ( $p < 0.0001$ ) for sorghum (30.42%), intermediate for steam-rolled sorghum (50.72%) and highest for corn (66.48%). The addition of thermostable amylase of *Bacillus licheniformis* increased the *in vitro* starch digestion of sorghum and corn; therefore, this enzyme could improve *in vivo* starch digestion and feed efficiency of grain based diets with low and intermediate rates of starch fermentation.

**Keywords:** Starch, digestion, enzymes, grains.

### INTRODUCTION

Ruminal starch digestion is one of the most important factors which determine productive performance of ruminants fed with diets with high content of grain (Britton and Stock, 1986). Several processes have been developed (dry-rolled, steam-rolled) to increase the starch digestion rate and the energetic value of grains (Owens *et al.*, 1997).

Use of exogenous amylolytic enzymes as a grain treatment or food additive for ruminants has received little attention. Amylolytic enzymes in the rumen are extracellular or cell-bound (Thurn and Kotarsky, 1987), and the extracellular enzymes are the most important in the group of amylolytic bacteria (Cotta, 1988). The

Recibido: Abril, 2000. Aprobado: Julio, 2001.

Publicado como ENSAYO en *Agrociencia* 35: 423-427. 20001.

aditivo alimenticio en rumiantes. Las enzimas amilolíticas en el rumen son extracelulares o ligadas a la membrana (Thurn y Kotarsky, 1987) y las extracelulares son las más importantes dentro de las bacterias amilolíticas (Cotta, 1988). Las amilasas están presentes en protozoarios (Mendoza *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1995) y en hongos ruminales (Yanke *et al.*, 1993).

Aun cuando las enzimas exógenas adicionadas al alimento de los rumiantes son degradadas por las proteasas ruminales, las enzimas celulolíticas (Beauchemin *et al.*, 1995) o amilolíticas (Romero *et al.*, 1992) pueden mejorar la respuesta de novillos debido a que muchas enzimas de origen microbiano son glucosiladas en laboratorio. Entonces, es posible que las enzimas adicionadas actúen sinérgicamente con las extracelulares producidas por los microorganismos del rumen.

*Bacillus licheniformis* es uno de los microorganismos más estudiados, ha sido modificado mediante ingeniería genética, y se usa para producir amilasas industriales (Declerk *et al.*, 1997), que pueden usarse para incrementar la digestión ruminal del almidón. El objetivo de este experimento fue investigar si la adición de una alfa-amilasa industrial de *Bacillus licheniformis* mejora la digestión *in vitro* del almidón de dos granos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron tres muestras de grano como sustrato: sorgo, sorgo rolado con vapor, y maíz; los que se secaron y molieron en un molino Cyclotec (Cyclone Sample Mill) con malla de 1 mm. El fluido ruminal (volúmenes iguales) se obtuvo 16 h después de la alimentación de dos ovinos (28 kg de peso vivo) fistulados ruminalmente y alimentados con una dieta con 50% de heno de alfalfa y 50% de concentrado comercial (14% PC). Posteriormente se filtró a través de una manta de cielo de cuatro capas para separar el material particulado, y se mezcló en una botella térmica (39°C) y gaseada con CO<sub>2</sub>. La saliva artificial de McDougall se mezcló con el líquido ruminal en una relación de 4:1 para preparar el inóculo, el cual se transfirió a tubos de polipropileno de 50 mL que contenían 500 mg de muestra de grano (Tilley y Terry, 1963). Los tratamientos consistieron en los granos con y sin 400 µL de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (Takatherm L-340, Enmex S.A. de C.V.) en cada tubo. Los mayores cambios en la digestión del almidón se dan entre las 8 y 12 h (Mendoza *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2000), por lo que las incubaciones se repitieron tres días consecutivos (seis tubos por tratamiento) para medir la desaparición *in vitro* del almidón a las 12 h de fermentación.

El almidón se midió como glucosa liberada a partir del almidón residual no fermentado en cada tubo incubado con la metodología descrita por Mendoza *et al.* (1995), cuantificando la glucosa por el método de glucosa oxidada (Gochman y Schmitz, 1972). La desaparición del almidón se calculó como la diferencia en el porcentaje de almidón inicial y residual.

El diseño fue de Bloques Completos al Azar Generalizado con un arreglo factorial de tratamientos (3x2); los datos se analizaron utilizando

amilasas are present in protozoa (Mendoza *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1995) and ruminal fungi (Yanke *et al.*, 1993).

Even though exogenous enzymes added to the food of ruminants are degraded by ruminal proteases, the cellulolytic (Beauchemin *et al.*, 1995) or amylolytic enzymes (Romero *et al.*, 1992) may improve the steer's response because most microbial enzymes are glucilated. Then it is possible that the added enzymes could be acting synergically with the extracellular ones produced by rumen microorganisms.

*Bacillus licheniformis* is one of the most studied microorganisms and has been modified by genetic engineering, and used to produce industrial amylases (Declerk *et al.*, 1997) which may be employed to increase ruminal starch digestion. The objective of this experiment was to determine if addition of an industrial alpha-amylase of *Bacillus licheniformis* improves *in vitro* starch digestion of two grains.

## MATERIALS AND METHODS

Three samples of grain were used as a substrate: sorghum, steam-rolled sorghum, and corn. These were oven dried and ground in a 1 mm screen Cyclotec mill (Cyclone Sample Mill). Ruminal fluid (equal volumes) was obtained 16 h after feeding from two ruminally fistulated sheep (28 kg body weight) feed with a diet containing 50% alfalfa hay and 50% commercial concentrate (14% PC) and squeezed through four sheets of cheesecloth to separate particulate matter. Ruminal fluid was mixed in a prewarmed thermos (39°C) gassed with CO<sub>2</sub>. The artificial McDougall saliva was mixed with ruminal fluid at a ratio 4:1 to prepare the inoculum, which was transferred to 50 ml polypropylene tubes with 500 mg of grain sample (Tilley and Terry, 1963). Treatments consisted in grains with or without 400 ml of alpha-amylase of *Bacillus licheniformis* (Thakatherm L-340, Enmex S.A. de C.V.) in each tube. Most changes in starch digestion occur between 8 and 12 hours (Mendoza *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2000), therefore incubations were repeated on three consecutive days (six tubes per treatment) to determine *in vitro* starch disappearance at 12 hours of fermentation.

Starch was determined as glucose released from residual unfermented starch in each incubated tube, as described by Mendoza *et al.* (1995), quantifying glucose with the Gochman and Schmitz (1972) glucose oxidase method. Starch disappearance was calculated as the difference in percentage between initial and residual starch.

Data were analyzed under a Generalized Randomized Complete Block Design with a factorial arrangement of treatments (3 x 2) using the block by treatment interaction as an estimator of the error term (Steel and Torrie, 1980). Incubation (day) was used as blocking criterium. Main effects were grain types and enzyme addition. Treatment means were compared by means of Tukey's test. Analysis of variance was performed using the GLM procedure of SAS (1985).

la interacción bloque por tratamiento para estimar el error, y la incubación como criterio de bloqueo (Steel y Torrie, 1980). Los efectos principales fueron el tipo de grano y la adición de la enzima, cuyas medias de tratamiento se compararon mediante la prueba de Tukey. El análisis de varianza se efectuó usando el procedimiento GLM del SAS (1985).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* incrementó ( $p < 0.0001$ ) la digestión *in vitro* del almidón de los granos (Cuadro 1) y no se detectó efecto de la interacción sustrato por enzima ( $p > 0.19$ ).

Al no ser significativa la interacción enzima por tipo de grano, las alfa-amilasas industriales podrían aplicarse a granos con tasa de digestión lenta e intermedia. El almidón de distintos granos se digiere con diferentes tasas en el rumen (Britton y Stock, 1986), mientras que el procesado incrementa la tasa de fermentación *in vitro* e *in vivo* (Mendoza *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1995).

Al incrementarse la digestión *in vitro* del almidón de los dos granos por efecto de la adición de la enzima exógena, es posible que también aumenten la digestibilidad *in vivo* del almidón en dietas basadas en granos de sorgo o maíz. La actividad amilolítica de *Bacillus licheniformis* varía de 10 a 100  $\mu\text{M s}^{-1}$  equivalentes de glucosa, la cual es más alta que la de bacterias (0.06 a 0.20  $\mu\text{M min}^{-1}$ ; Cotta, 1988; Noziere y Michalet-Doreau, 1997), protozoarios (0.08  $\mu\text{M min}^{-1}$ ; Mendoza *et al.*, 1995) y hongos (167-291  $\mu\text{M h}^{-1}$ ; Yanke *et al.*, 1993).

Las amilasas termoestables de *Bacillus licheniformis* actúan por difusión en el grano (Helbert *et al.*, 1996) y muestran una alta actividad con pH de 4 a 9 (óptimo de 7.0) y temperaturas de 30 a 90 °C (Dobrevá *et al.*, 1994; Bosse y Das, 1996) con un óptimo de 76 °C (Ingle y Erickson, 1978). Aun cuando las condiciones fisicoquímicas del rumen no son las óptimas y que la enzima puede ser degradada por las proteasas de los microorganismos ruminales, los resultados mostrados aquí indican que estas amilasas pueden ser útiles y podrían estar actuando sinérgicamente con las enzimas extracelulares sintetizadas por las bacterias amilolíticas cultivadas *in vitro* dadas las condiciones de temperatura, pH, solución, mezcla, etc. Algunas cepas industriales de *Bacillus licheniformis* (Ingle y Erickson, 1978; Declerk *et al.*, 1997) pueden tener condiciones de actividad cercanas a las características fisicoquímicas del rumen, y se podrían investigar en rumiantes alimentados con dietas basadas en granos con tasas de digestión bajas e intermedias, como sorgo y maíz.

La estabilidad de la enzima podría no ser un factor de limitación para su uso en la alimentación animal. En el experimento de Romero *et al.* (1992), las amilasas se mezclaron con el alimento un día antes de la alimentación, como se usan otras enzimas fibrolíticas comerciales;

## RESULTS AND DISCUSSION

Addition of alpha-amylase of *Bacillus licheniformis* increased ( $p < 0.0001$ ) *in vitro* starch digestion of the grains (Table 1) and there was no substrate by enzyme interaction ( $p > 0.19$ ).

Since there was no significance of grain type by enzyme interaction, industrial alfa-amylases could be applied in grains with slow and intermediate digestion rate. Starch of several grains is digested in the rumen to different rates (Britton and Stock, 1986), whereas the processed starch increases *in vitro* and *in vivo* fermentation rate (Mendoza *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1995).

When *in vitro* starch digestion of the two grains increases by adding the exogenous enzyme, it is possible that *in vivo* starch digestibility increases as well in diets based in sorghum or corn. Amylolytic activity of *B. licheniformis* varies from 10 to 100  $\mu\text{M s}^{-1}$  of glucose equivalent, which is higher than the one reported for bacteria (0.06 to 0.20  $\mu\text{M min}^{-1}$ ; Cotta, 1988; Noziere and Michalet-Doreau, 1997), protozoa (0.08  $\mu\text{M min}^{-1}$  Mendoza *et al.*, 1995), and fungi (167-291  $\mu\text{M h}^{-1}$ ; Yanke *et al.*, 1993).

Thermostable amylases of *Bacillus licheniformis* act by diffusion in the grain (Helbert *et al.*, 1996), and show a high activity in a pH range of 4 to 9 (optimum 7.0) and in a temperature range of 30 to 90 °C (Dobrevá *et al.*, 1994; Bosse and Das, 1996) with an optimum of 76 °C (Ingle and Erickson, 1978). Even when the physicochemical conditions of the rumen are not optimal and the enzyme can be degraded by proteases of rumen microorganisms, the results shown here indicate that these amylases can be useful and could be acting synergically with extracellular enzymes produced by amyolytic bacteria cultivated *in vitro*, given conditions of temperature, pH, solution, and mixture. Some industrial

**Cuadro 1. Efecto de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (Takaterm L-340) en la digestión *in vitro* del almidón a las 12 h de fermentación.**

**Table 1. Effect of *Bacillus licheniformis* alfa-amylase (Takaterm L-340) *in vitro* starch digestion at 12 h of fermentation.**

Concepto	Digestión <i>in vitro</i> del almidón, %
Testigo	38.48a <sup>†</sup>
Alfa-amilasa	59.93b
EE	0.74
Grano de sorgo	30.42c <sup>‡</sup>
Sorgo rolado con vapor	50.72e
Maíz	66.48d
EE	0.91

<sup>†</sup> Efecto de la enzima, estadísticamente diferentes ( $p < 0.0001$ ).

<sup>‡</sup> Efecto del tipo de grano, estadísticamente diferentes ( $p < 0.0001$ ).

EE = Error estándar

sin embargo, las amilasas pueden ser estables por mayor tiempo. La glucosa isomerasa, una enzima comercial utilizada en la industria panadera, tiene un tiempo de vida media entre 15 a 25 días mezclada con el almidón; otras enzimas son activas por un año cuando se mezclan con almidón y la humedad es baja (Potthast, 1978).

El uso de enzimas exógenas podría ser un método eficiente para incrementar la digestión del almidón. La actividad amilolítica de las bacterias ruminales se incrementa cuando los granos se adicionan a dietas (Palmquist y Baldwin, 1966), y puede aumentarse con la mezcla de granos en dietas altas en concentrados (Mendoza *et al.*, 1991). La actividad amilolítica varía según el substrato utilizado por las bacterias (Cotta, 1988) y protozoarios (Coleman, 1986), pero la más alta actividad de cualquier microbio del rumen es inferior a la actividad del *Bacillus licheniformis* industrial hipermutante (Declerk *et al.*, 1997; Sidhu *et al.*, 1997).

Los resultados de este experimento indican que la digestión *in vitro* del almidón se incrementó 55% con la amilasa industrial termoestable. Se podría esperar una actividad más alta si la degradación ruminal de las enzimas es manipulada por ingeniería genética cambiando la configuración de la enzima (Klibanov, 1983) por enlaces covalentes (Horigome *et al.*, 1974) o por glucosilación.

### CONCLUSIONES

La adición de amilasas termoestables de *Bacillus licheniformis* incrementó la digestión *in vitro* del almidón de los dos granos. Por tanto, es posible que estas amilasas también aumenten la digestibilidad *in vivo* del almidón de granos con tasa de digestión lenta e intermedia y, de esa manera, se mejoraría la eficiencia de dietas con esos granos.

### AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 27923B.

### LITERATURA CITADA

- Beauchemin, K.A., L.M. Rode, and V.J. Sewalt. 1995. Fibrolytic enzyme increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Can. J. Anim. Sci.* 75:641-644.
- Bosse, K., and D. Das. 1996. Thermostable alpha-amylase production using *Bacillus licheniformis* NRRL B14368. *Indian J. Exp. Biol.* 34:1279-1282.
- Britton, R.A., and R.A. Stock. 1986. Acidosis, rate of starch digestion and intake. *In: Oklahoma State University (ed.), Feed Intake by Beef Cattle. MP 121. Proceedings of a Symposium, Animal Science Department, Agricultural Experiment Station, Oklahoma.* pp: 125-136.
- Coleman, G.S. 1986. The amylase activity of 14 species of entodiniomorphid protozoa and the distribution of amylase in rumen digesta fractions of sheep containing no protozoa or one of

strains of *Bacillus licheniformis* (Ingle and Erickson, 1978; Declerk *et al.*, 1997) may have conditions of activity close to the physico-chemical characteristics of the rumen and they could be studied in ruminants fed with high grain diets of slow and intermediate digestion rate such as sorghum and corn.

The stability of the enzyme might not be a limiting factor for its use in animal nutrition. In Romero *et al.* 1992, amylases were mixed with food a day before the feeding, the way in which other commercial fibrolytic enzymes are used. However, amylases can be stable for a longer time. Glucose isomerase, a commercial enzyme used in the baking industry, has an average life span of 15 to 25 days mixed with starch; other enzymes are active up to one year when mixed with starch and humidity is low (Potthast, 1978).

Use of external enzymes could be an efficient method to increase starch digestion. Amylolytic activity of ruminal bacteria increases when grains are added to the diet (Palmquist and Baldwin, 1966), and could increase with grain mixtures in highly concentrated diets (Mendoza *et al.*, 1991). Amylolytic activity also varies according to the substrate used in bacteria (Cotta, 1988) and protozoa (Coleman, 1986), but the highest activity of any rumen microbe is lower than the activity of industrial hypermutant *Bacillus licheniformis* (Declerk *et al.*, 1997; Sidhu *et al.*, 1997).

The results of this experiment indicate that *in vitro* starch digestion increased by 55% with the industrial thermostable amylase. A higher activity could be expected if ruminal enzyme degradation is manipulated by genetic engineering, changing the enzyme configuration (Klibanov, 1983) by covalent bonding or by glucosilation (Horigome *et al.*, 1974).

### CONCLUSIONS

Addition of thermostable amylase of *Bacillus licheniformis* increased *in vitro* starch digestion of two grains and it is possible that these amylases also increase *in vivo* digestibility of grains with slow and intermediate digestion rate and, this way, could improve the diet efficiency with these grains.

—End of the English version—



- seven different protozoal populations. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 107:709-721.
- Cotta, M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:772-776.
- Declerk, N., M. Machius, R. Chambert, G. Wiegand, R. Huber, and C. Gallardin. 1997. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: Thermodynamic studies and structural interpretation. *Prot. Engin.* 10:541-549.

- Dobrevá, E., V. Ivanova, and E. Emanuilova. 1994. Effect of temperature on some characteristics of the thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *World J. Microbiol. Biotech.* 10: 547-550.
- Gochman, N., and J.M. Schmitz. 1972. Application of a new peroxide indicator reaction to the specific, automated determination of glucose with glucose oxidase. *Clin. Chem.* 18:943-952.
- Helbert, W., M. Schulein, and B. Henrissat. 1996. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase into corn starch granules. *Intl. J. Biol. Macro.* 19:165-169.
- Horigome, T., H. Kasai, and T. Okuyama. 1974. The stability of Taka-amylase A immobilized on various sizes matrix. *J. Biochem.* 75:299-307.
- Ingle, M.R., and R.J. Erickson. 1978. Bacterial alpha-amylases. *Adv. Appl. Microbiol.* 24:257-278.
- Klibanov, A.M. 1983. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv. Appl. Microbiol.* 29:1-27.
- Mendoza, M.G.D., R.A. Britton, and R.A. Stock. 1991. Effect of feeding mixtures of high moisture corn and dry rolled grain sorghum on starch digestion and ruminal protozoa. *J. Anim. Sci.* 69:512 (Suppl. 1).
- Mendoza, M.G.D., R.A. Britton, and R.A. Stock. 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71:1572-1578.
- Mendoza, M.G.D., R.A. Britton, and R.A. Stock. 1995. Effect of protozoa and urea level on *in vitro* starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 54:315-325.
- Mendoza, M.G.D., R.A. Britton, and R.A. Stock. 1998. Ruminal fermentation and *in situ* starch digestion with high moisture corn, dry rolled grain sorghum or a mixture of these grains. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 74:329-335.
- Mendoza, M.G.D., M.E. Ortega, R.V. Ricalde, y J.A.G. Martínez. 2000. Modelos matemáticos para evaluar la tasa de digestión *in vitro* del almidón. *Téc. Pecu. Méx.* 38:51-65
- Noziere, P., and B. Michalet-Doreau. 1997. Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* 73:417-476.
- Owens, F.N., D.S. Secrist, W.J. Hill, and D.R. Gill. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 75:868-879.
- Palmquist, D.L., and R.L. Baldwin. 1966. Enzymatic techniques for the study of pathways of carbohydrate utilization in the rumen. *Appl. Microbiol.* 14:60-69.
- Potthast, K. 1978. Influence of water activity on enzymic activity in biological systems. *In: Fennema O. (ed.) Dry Biological Systems.* Academic Press, Inc. pp. 323-342.
- Romero B., M., J. López A., y A. Gómez R. 1992. Digestibilidad de dietas de engorda tratadas con enzimas para grano de sorgo. *In: Memoria de la reunión nacional de investigación pecuaria.* Chihuahua, Chih. pp: 181.
- Sidhu, G.S., P.Sharma, T. Charkrabarti and J.K. Gupta. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable alpha-amylase. *Enzyme and Microb. Technol.* 21:525-530.
- SAS Institute. 1985. *SAS User's Guide: Statistics.* Ver.5. SAS Institute. Cary, N.C. USA. 956 p.
- Steel, R.G.D., and J.H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach (2nd Ed.)*. McGraw-Hill Book Co. New York. 633 p.
- Thurn, K.K., and S.F. Kotarski. 1987. Subcellular localization of starch-degrading enzymes in *Bacteroides rumenicola*. *In: 19th Biennial Conference on Rumen Function.* Chicago, Illinois. 30 p.
- Tilley, J.M.A., and R.A. Terry. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassld. Soc.* 18:104-109.
- Yanke, L.J., Y. Dong, T.A. Callisterm, H.D. Baem, and K.J. Cheng. 1993. Comparison of amylolytic activities of ruminal fungi grown on cereal grains. *Can. J. Microbiol.* 39:817-820.