



## Fermentasi Tepung Ganyong (*Canna edulis* Ker.) untuk Produksi Etanol oleh *Aspergillus niger* dan *Zymomonas mobilis*

*Ethanol fermentation from solid waste of tapioca  
(onggok) by Aspergillus niger and Zymomonas mobilis*

SUSANTI ENI PURWANTARI, ARI SUSILOWATI<sup>♥</sup>,  
RATNA SETYANINGSIH

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126

Diterima: 10 Nopember 2003. Disetujui: 1 Mei 2004.

### ABSTRACT

The aims of this research were to know the concentration of arrowroot flour which produced the highest reducing sugar in saccharification process by *A. niger*, as well as to know the efficiency of ethanol production by *Z. mobilis*. The framework of this research was the increasing needs of ethanol; meanwhile ethanol could be obtained from the fermentation arrowroot. This research was carried out in two stages. In the saccharification stage, there are four concentrations, namely: 10%, 20%, 30% and 40%, and *A. niger* concentration of 10% (v/v) for each arrowroot flour concentration with spores amount  $3,3 \times 10^6$ /mL. The parametric measurement includes: starch concentration in the starting day and the sixth day, while the reducing sugar concentration and pH was measured every 24 hours during 6 days. In the ethanol fermentation, *Z. mobilis* concentration have been used 10% (v/v) with cells amount  $5,1 \times 10^7$ /mL and it was used in solution product of arrowroot starch saccharification and parametric measurement carried out during 72 hours includes: ethanol and reducing sugar concentration and the growth of *Z. mobilis* cells. The data resulted from parametric measurement. The result of the research showed that arrowroot flour concentration of 10% produced the highest reducing sugar in process of saccharification with reducing sugar concentration was 1,230 g/100 mL in four days and the efficiency of ethanol production by *Z. mobilis* during 72 hours was 83,03%.

---

#### ♥ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126  
Tel. & Fax.: +62-271-663375.  
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

**Keywords:** arrowroot starch, *Aspergillus niger*, fermentation, ethanol, *Zymomonas mobilis*.

### PENDAHULUAN

Kebutuhan bahan bakar semakin meningkat, sementara itu persediaan bahan bakar petroleum dan batu bara semakin menipis. Kondisi ini menyebabkan negara-negara industri berlomba mencari sumber energi bahan bakar alternatif. Dalam penelitian diperoleh bahwa etanol dapat dijadikan sebagai sumber alternatif untuk bahan bakar. Etanol dapat diperoleh melalui fermentasi bahan berkarbohidrat seperti tepung ganyong

dengan menggunakan bantuan mikroba *A. niger* guna memecah pati menjadi glukosa dan *Z. mobilis* guna mengubah glukosa menjadi etanol.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui (i) konsentrasi tepung ganyong yang menghasilkan gula reduksi paling tinggi pada proses sakarifikasi oleh *A. niger*; (ii) efisiensi pembentukan etanol dari gula reduksi hasil sakarifikasi pati ganyong dalam fermentasi oleh *Z. mobilis*.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Sub Lab Biologi Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian dikerjakan pada bulan Januari-Mei 2003.

### Bahan dan alat

Bahan pati ganyong (*Canna edulis* Ker), biakan murni *Zymomonas mobilis* (FNCC 056) dan *Aspergillus niger* (FNCC 6018) dari PAU Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta; medium starter *Zymomonas mobilis*; medium PGY (*Pepton Glukosa Yeast Ekstract*) dan PDA (*Potato Dextrosa Agar*); akuades.

Alat yang diperlukan: tabung reaksi, pH meter, lup inokulasi, kulkas, erlenmeyer, *rotary shaker*, gelas baker, sentrifus, kompor listrik, inkubator, pipet, autoklaf, gelas ukur, *waterbath*, spektrofotometer, perangkat distilasi mikroskop, haemocytometer, *coloni counter*.

### Cara Kerja

**Penyiapan alat dan bahan.** Semua alat dan medium yang digunakan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

**Penyediaan inokulum *Aspergillus niger*.** Isolat *A. niger* ditumbuhkan pada medium PDA selama 3-5 hari pada suhu 35-37°C. Setelah terbentuk massa spora, spora disuspensikan dalam akuades, kemudian diambil 1 mL untuk dihitung sampai didapatkan jumlah spora dalam 10% inokulum *A. niger* di medium PGY sebanyak  $3,3 \times 10^6$ /mL dan diinkubasi dengan *rotary shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam sehingga spora *A. niger* berbentuk pelet.

**Pembuatan bubur tepung ganyong.** Bubur dibuat empat variasi konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, dan 40%, masing-masing bervolume 150 mL dan dibuat dua ulangan setiap proses. Bubur kemudian dipanaskan selama 10 menit dan disterilisasi.

**Tahap sakarifikasi.** Inokulum *A. niger* yang berbentuk pelet diinokulasikan ke dalam tiap-tiap konsentrasi bubur tepung ganyong, kemudian diinkubasi selama 6 hari pada suhu 50°C dengan penggoyangan. Sebelum penginokulasian *A. niger* terlebih dahulu bubur tepung ganyong diberi 1 tetes HCl 25%. Untuk menghitung besarnya pati yang terhidrolisis digunakan rumus (Kumalaningsih dan Hidayat, 1995):

Pati yang terhidrolisis = pati awal - pati akhir

**Peningkatan volume larutan hasil sakarifikasi untuk fermentasi etanol.** Dari pengamatan hasil sakarifikasi pati ganyong dapat diketahui konsentrasi tepung ganyong yang menghasilkan gula reduksi paling tinggi. Dari data tersebut kemudian dibuat perlakuan yang sama untuk memperbanyak larutan hasil sakarifikasi. Kemudian larutan hasil sakarifikasi disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

**Penyediaan inokulum *Z. mobilis*.** Satu loop *Z. mobilis* diinokulasikan pada medium starter sebanyak 80 mL. Kemudian inokulum *Z. mobilis* diinkubasi pada suhu kamar dengan penggoyangan selama 4 jam sehingga didapatkan jumlah sel  $5,1 \times 10^7$ /mL.

**Tahap fermentasi etanol.** Ke dalam larutan hasil sakarifikasi diinokulasikan 10% inokulum *Z. mobilis*. Fermentasi dilakukan selama 72 jam pada suhu kamar. Besarnya laju pembentukan etanol dan efisiensi pembentukan etanol dapat dihitung dengan persamaan (Crueger dan Crueger, 1984):

$$\text{Laju pembentukan etanol} = \frac{\text{Produk(etanol)}}{\text{Waktu (jam)}}$$

$$\text{Efisiensi fermentasi} = \frac{\text{Yield (produk/substrat)}}{\text{alkohol yang dihasilkan secara teoritis dari glukosa}} \times 100\%$$

### Teknik pengumpulan data

Data diperoleh melalui pengukuran parameter. Pada tahap sakarifikasi yang berlangsung selama 6 hari, pengukuran meliputi: (i) Konsentrasi pati (metode "Direct Acid Hydrolysis"), pada hari ke-0 dan ke-6 sakarifikasi. (ii) Konsentrasi gula reduksi (metode Nelson-Somogyi cara spektrofotometri), dilakukan tiap 24 jam selama 6 hari proses sakarifikasi. (iii) pH (pHmeter), dilakukan tiap 24 jam selama 6 hari proses sakarifikasi.

Tahap fermentasi etanol, pengukuran dilakukan tiap 24 jam selama 72 jam, meliputi: (i) Konsentrasi etanol (metode destilasi). (ii) Konsentrasi gula reduksi (metode Nelson-Somogyi cara spektrofotometri). (iii) Jumlah sel *Z. mobilis* (metode turbidimetrik).

### Analisis data

Data dianalisis dari grafik yang diperoleh dari setiap pengukuran parameter tiap 24 jam, kemudian membandingkan tiap grafik untuk mengetahui konsentrasi tepung ganyong yang menghasilkan gula reduksi paling tinggi dalam

proses sakarifikasi. Besarnya efisiensi pembentukan etanol dari gula reduksi hasil sakarifikasi dalam fermentasi oleh *Z. mobilis* diperoleh melalui penghitungan berdasarkan data dari tiap pengukuran.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

*Proses pemecahan pati ganyong menjadi gula reduksi oleh A. niger*

Hasil pengukuran konsentrasi pati pada tiap konsentrasi tepung ganyong dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Konsentrasi pati (g/100 mL) dari bubur tepung ganyong pada berbagai konsentrasi hari ke-0 dan ke-6 sakarifikasi oleh *A. niger*.

Waktu (hari)	10%	20%	30%	40%
0	5,51	10,71	12,88	17,44
6	0,50	3,60	8,30	11,50

Hasil pengamatan selama 6 hari proses sakarifikasi menunjukkan terjadinya penurunan konsentrasi pati. Penurunan konsentrasi pati disebabkan adanya enzim yang dihasilkan oleh *A. niger* yaitu  $\alpha$ -amilase dan glukamilase yang mampu menghidrolisis pati. Enzim  $\alpha$ -amilase mampu memutus ikatan  $\alpha$ -1,4 secara acak di bagian dalam dari pati, baik dalam amilosa maupun amilopektin. Akibat dari aktivitas tersebut rantai pati terputus-putus menjadi maltosa, maltotriosa, glukosa dan dekstrin. Sedangkan enzim glukamilase akan memecah ikatan  $\alpha$ -1,4 maupun  $\alpha$ -1,6 glikosida pada molekul pati menjadi gula reduksi (Stewart, 1984; Fardiaz, 1988).

Dari Tabel 1 berdasarkan pengurangan pati awal dan pati akhir diperoleh bahwa pada konsentrasi 10% besarnya pati yang terhidrolisis 5,01 g/100 mL. Pada konsentrasi 20% pati yang terhidrolisis sebesar 7,11 g/100 mL. Pada konsentrasi 30% pati yang terhidrolisis sebesar 4,58 g/100 mL dan konsentrasi 40% pati yang terhidrolisis sebesar 5,94 g/100 mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *A. niger* memiliki kemampuan menghidrolisis pati yang hampir sama pada setiap konsentrasi tepung ganyong.

Pati yang terdapat pada umbi-umbian memiliki dua jenis polimer, yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa terdiri dari rantai unit-unit D-gula reduksi yang panjang dan tidak bercabang, digabungkan oleh ikatan  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) sehingga amilosa akan terlarut dalam air panas.

Amilopektin memiliki berat molekul yang tinggi tetapi strukturnya bercabang. Ikatan glikosida yang menggabungkan rantai amilopektin adalah ikatan  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6), sehingga amilopektin tidak mudah larut dalam air panas melainkan akan terjadi pengentalan jika dipanaskan (Lehninger, 1982). Komposisi amilopektin pada pati ganyong lebih besar dari pada amilosa, sehingga semakin besar konsentrasi tepung ganyong bubuk pati akan semakin mengental yang akhirnya akan menggumpal dan menjadi keras.

Adanya aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dan glukamilase yang dihasilkan dari *A. niger* menyebabkan pati terhidrolisis menjadi gula reduksi, sehingga pada proses sakarifikasi pati ganyong terjadi penurunan konsentrasi pati dari hari ke-0 dan hari ke-6 sakarifikasi dan terjadi peningkatan konsentrasi gula reduksi. Perolehan konsentrasi gula reduksi dari hari ke-0 sampai hari ke-6 dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Konsentrasi gula reduksi (g/100 mL) pada berbagai konsentrasi tepung ganyong selama 6 hari proses sakarifikasi oleh *A. niger*.

Waktu (hari)	10%	20%	30%	40%
0	0,152	0,125	0,108	0,086
1	0,458	0,357	0,467	0,275
2	0,596	0,550	0,577	0,321
3	1,178	0,943	0,820	0,867
4	1,230	0,946	0,787	0,688
5	1,150	1,120	0,974	1,040
6	1,194	1,120	0,996	0,886

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa konsentrasi gula reduksi terbesar diperoleh dari konsentrasi tepung ganyong 10% di hari ke-4, yaitu sebesar 1,230 g/100 mL. Sedangkan konsentrasi tepung ganyong 20% gula reduksi terbesar 1,120 g/100 mL pada hari ke-5, konsentrasi tepung ganyong 30% gula reduksi terbesar 0,996 g/100 mL di hari ke-6, konsentrasi tepung ganyong 40% gula reduksi terbesar 1,040 g/100 mL di hari ke-5.

Berdasarkan besarnya pati yang terhidrolisis diperoleh bahwa konsentrasi tepung ganyong 20% paling banyak terhidrolisis yaitu 7,11 g/100 mL, namun konsentrasi gula reduksi terbesar diperoleh dari konsentrasi tepung ganyong 10%. Hal tersebut disebabkan kondisi substrat 10% lebih cair dari pada konsentrasi 20%, sehingga proses sakarifikasi oleh *A. niger* terjadi lebih merata pada seluruh substrat dibanding dengan 20%. Pada konsentrasi 20% pati yang terhidrolisis masih banyak dalam bentuk dekstrin. Sardjoko (1991) serta Hendersen dan

Norman (1995) melaporkan bahwa  $\alpha$ -amilase dan glukamilase bekerja optimal pada konsentrasi pati jagung mentah 30%, namun dalam penelitian ini diperoleh konsentrasi 10% yang optimal. Perbedaan ini disebabkan pati yang dipakai berbeda.

Penurunan pH juga terjadi pada tiap konsentrasi ganyong selama proses ini berlangsung, meskipun perubahan pH ini relatif kecil. Perubahan pH selama proses sakarifikasi dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Perubahan pH bubur tepung ganyong pada berbagai konsentrasi selama 6 hari proses sakarifikasi oleh *A. niger*.

Waktu (hari)	10%	20%	30%	40%
0	4,4	4,5	4,4	4,5
1	3,9	3,9	4,0	4,0
2	3,2	3,3	3,3	3,3
3	3,0	3,0	3,0	3,1
4	2,8	2,8	2,9	2,9
5	2,9	2,9	2,9	3,1
6	2,9	3,0	3,0	3,0

Aktivitas kerja enzim  $\alpha$ -amilase dan glukamilase terjadi pada pH 4,0-5,0 (Yasmeen *et al*, 2002). Untuk menyediakan pH tersebut maka sebelum *A. niger* diinokulasikan, substrat terlebih dulu ditambah HCl 25%. Dalam hal ini penambahan HCl bertujuan untuk membantu terhidrolisisnya pati di awal proses dan menyediakan pH untuk aktivitas kerja enzim  $\alpha$ -amilase dan glukamilase.

Pada hari ke-0 pH tiap konsentrasi berkisar antar 4,4-4,5 dan tiap hari mengalami sedikit penurunan sampai pada pH 3,1-3,3 pada hari ke-6. Terjadinya penurunan pH selama proses sakarifikasi berlangsung karena *A. niger* juga mampu mengubah glukosa untuk menghasilkan senyawa organik lain terutama asam sitrat (Rogers *et al*, 1993), sehingga diperoleh pH yang sangat asam.

*A. niger* memiliki pH optimum untuk pertumbuhan 4,0-6,5, sehingga penurunan pH sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan *A. niger*. Pada hari ke-4 sakarifikasi pH diperoleh sangat asam yang dapat mematikan *A. niger*, akibatnya produksi enzim  $\alpha$ -amilase dan glukamilase oleh *A. niger* juga terhambat. Penghambatan tersebut akhirnya menghambat proses pemecahan pati menjadi gula reduksi.

Gula reduksi terbesar yang dihasilkan pada proses sakarifikasi hanya 1,230 g/100 mL, hal ini disebabkan suhu dan pH yang digunakan tidak

menyesuaikan untuk pertumbuhan optimal *A. niger* melainkan suhu dan pH optimum untuk kerja  $\alpha$ -amilase dan glukamilase, sehingga *A. niger* tidak dapat bekerja secara optimal.

#### *Peningkatan volume larutan hasil sakarifikasi untuk fermentasi etanol*

Dari hasil sakarifikasi selama 6 hari didapat bahwa konsentrasi tepung ganyong 10% yang menghasilkan gula reduksi paling tinggi, yaitu sebesar 1,230 g/100 mL pada hari ke-4. Oleh karena itu konsentrasi tepung ganyong 10% selanjutnya digunakan untuk produksi gula reduksi yang akan digunakan dalam fermentasi etanol. Setelah proses produksi berlangsung 4 hari, didapat volume larutan hasil sakarifikasi sebanyak 800 mL dengan konsentrasi gula reduksi sebesar 1,996 g/100 mL.

#### *Fermentasi etanol oleh Z. mobilis*

Fermentasi etanol berlangsung selama 72 jam. Konsentrasi inokulum *Z. mobilis* yang digunakan sebesar 10% (v/v) dengan jumlah sel sebanyak  $5,1 \times 10^7$ /mL. Parameter yang diukur dalam fermentasi etanol meliputi: konsentrasi gula reduksi, konsentrasi etanol dan jumlah sel *Z. mobilis* yang diukur setiap 24 jam selama 72 jam. Pengukuran konsentrasi gula reduksi dan etanol bertujuan untuk mengetahui efisiensi dan laju pembentukan etanol dari gula reduksi oleh *Z. mobilis*. Dalam proses ini akan terjadi pengubahan gula reduksi menjadi etanol. Perubahan konsentrasi gula reduksi dan etanol dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Konsentrasi gula reduksi (g/100 mL) dan etanol (%) selama 72 jam fermentasi etanol oleh *Z. mobilis*.

Waktu (jam)	Gula reduksi (g/100 mL)	Etanol (% v/v)
0	1,996	0
24	0,623	0,53
48	0,428	0,67
72	0,272	0,73

Dari Tabel 4 terlihat bahwa gula reduksi sebagai substrat fermentasi setiap harinya semakin menurun tetapi etanol semakin meningkat. Besarnya gula reduksi awal, yaitu 1,996 g/100 mL turun menjadi 0,272 g/100 mL setelah 72 jam fermentasi. Sedangkan etanol mengalami kenaikan dari 0% (v/v) pada awal fermentasi menjadi 0,73% (v/v) setelah 72 jam fermentasi.

Penurunan gula reduksi yang diiringi dengan meningkatnya konsentrasi etanol disebabkan adanya enzim yang dihasilkan oleh *Z. mobilis*, diantaranya yaitu glukokinase dan fruktokinase yang mampu mengubah gula reduksi menjadi etanol (Pak-Lam-Yu, 1990). Enzim glukokinase dan fruktokinase yang dihasilkan *Z. mobilis* mampu mengubah gula reduksi menjadi etanol melalui jalur Entner-Doudoroff (ED) yang melakukan metabolisme gula reduksi melalui 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonat membentuk piruvat, kemudian piruvat oleh piruvat dekarboksilase diubah menjadi asetaldehid yang kemudian direduksi menjadi etanol (Fardiaz, 1988).

Dalam fermentasi etanol juga dilakukan penghitungan jumlah sel *Z. mobilis* untuk melihat pertumbuhan sel pada gula reduksi hasil sakarifikasi pati ganyong selama 72 jam fermentasi berlangsung. Banyaknya jumlah sel selama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Jumlah sel *Z. Mobilis* (mL) selama 72 jam fermentasi etanol.

Waktu (jam)	Log jumlah sel	Jumlah sel
0	7,70	$5,1 \times 10^7$
24	8,70	$5,0 \times 10^8$
46	8,18	$1,5 \times 10^8$
72	7,74	$5,5 \times 10^7$

Peningkatan jumlah sel *Z. mobilis* pada 24 jam pertama disebabkan adanya gula reduksi sebagai substrat yang masih cukup banyak (1,996 g/100 mL). Kenaikan jumlah sel *Z. mobilis* dan konsentrasi etanol menunjukkan bahwa gula reduksi hasil sakarifikasi dapat digunakan sebagai substrat oleh *Z. mobilis* untuk pertumbuhan dan produksi etanol.

Konsentrasi etanol yang diperoleh dan jumlah sel menunjukkan bahwa pada 24 jam pertama proses fermentasi, konsentrasi etanol naik dengan cepat (dari 0% menjadi 0,53%) diiringi juga dengan kenaikan jumlah sel yang besar (dari  $5,1 \times 10^7$ /mL menjadi  $5,0 \times 10^8$ /mL). Sedangkan pada jam ke-48 dan ke-72 proses fermentasi, jumlah sel menurun dan etanol yang dihasilkan terjadi kenaikan. Penurunan jumlah sel terjadi karena gula reduksi yang ada tinggal sedikit (0,623 g/100 mL) sehingga dalam metabolisme selnya gula reduksi dipakai untuk menghasilkan energi daripada untuk pelipatgandaan jumlah sel maka yang terjadi jumlah sel mengalami penurunan dan etanol mengalami peningkatan.

Besarnya laju pembentukan etanol selama 72 jam adalah 0,24% per 24 jam dan efisiensi pembentukan etanol oleh *Z. mobilis* selama 72

jam sebesar 83,03%. Rendahnya konsentrasi etanol disebabkan konsentrasi gula reduksi yang dijadikan substrat sangat kecil (1,996 g/100 mL). Tinggi rendahnya konsentrasi etanol selain ditentukan oleh mikroba juga sangat ditentukan oleh tinggi rendahnya konsentrasi gula reduksi yang digunakan sebagai substrat dalam fermentasi (Wen and Cheng, 2000). Sehingga semakin tinggi konsentrasi gula reduksi yang digunakan sebagai substrat makin tinggi juga konsentrasi etanol yang dihasilkan dalam fermentasi oleh *Z. mobilis*.

## KESIMPULAN

Pati ganyong dapat dimanfaatkan untuk produksi etanol melalui sakarifikasi dan fermentasi etanol. Pada proses sakarifikasi dengan *A. niger*, konsentrasi tepung ganyong 10% menghasilkan gula reduksi yang paling tinggi, yaitu 1,230 g/100 mL dalam waktu yang lebih singkat (4 hari) dibandingkan dengan konsentrasi tepung ganyong 20%, 30%, dan 40%.

Efisiensi pembentukan etanol dari gula reduksi hasil sakarifikasi oleh *Z. mobilis* yaitu 83,03% dengan besarnya laju pembentukan etanol 0,24 % per 24 jam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: PAU IPB.
- Hendersen, S and B.E. Norman. 1995. *Enzymatic Modification of Food Carbohydrates*, In *Chemical Aspects of Food Enzymes*. New York: Marcell Dekkes Inc.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Penerjemah: Thenawidjaja, M. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Pak, Lam-Yu. 1990. *Fermentation Technologies-Industrial Application*. New York: Elsevier Applied Science.
- Roger, S., D. Michael, and A.A. Edward. 1993. *The Microbial World*. New Jersey: Practice-Hall Inc.
- Sardjoko. 1991. *Bioteknologi, Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Stewart, G.G., Panchal, C.J., Russel, I and Sills, A.M. 1984. *Biology of Ethanol Producing Microorganisms*. Critical Review Biotechnol.
- Wen, C.L., and T.H. Cheng. 2000. Modeling of ethanol using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on media containing glucose and fructose. *Biochemical Engineering Journal* 217- 227.
- Yasmeen, A., R. Shahid, F. Latif, and M.I. Rajoka. 2002. *Ethanol Production from Raw Corn Strach by Saccharification with Glucoamylase from Aspergillus niger Mutant M115 and Fermentation with Saccharomyces cerevisiae*. Pakistan: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE). [www.cl.orime.gov/symposium/indec\\_files/porter06.23.htm](http://www.cl.orime.gov/symposium/indec_files/porter06.23.htm) [03/01/02].