การผลิตแอลกอฮอล์จาก whey โดยยีสต์ Kluyveromyces marxianus

เกรียงไกร นาคะเกศ

การผลิตเนยแข็งเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญอย่างหนึ่ง สิ่งที่เหลือจากการทำเนยแข็ง เรียกว่า "whey" ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายกับนม แต่มีโปรตีนน้อยกว่า เนื่องจากโปรตีนถูกแยกออกไปทำเนยแข็ง ระหว่างกระบวนการผลิต whey ซึ่งเหลือจากการผลิตเนยแข็งนี้ส่วนใหญ่นำไปผสมเป็นอาหารสัตว์ แต่ถ้ามีปริมาณมากอาจก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นการใช้ประโยชน์จาก whey จึงนับว่ามีความสำคัญ และเนื่องจาก whey มีแล็คโทสหรือน้ำตาลนมเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ การเลือกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลแล็คโทสเป็น substrate เพื่อผลิตแอลกอฮอล์จึงเป็นโครงการหนึ่งของการใช้ประโยชน์จาก whey

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อเลือกยีสต์ที่ใช้น้ำตาลแล็คโทสใน whey เป็น substrate ได้

2. เพื่อลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหลังการหมักแอลกอฮอล์ จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะเลือกยีสต์ที่ตกตะกอนได้เองเมื่อกระบวนการหมักเสร็จสิ้นลง

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ยีสต์ Kluyveromyces marxianus สายพันธุ์ y42, y610, 102, 1496, y113, TC2, Ti และ Saccharomyces fragilis 100 ในการทดลองครั้งนี้

วิธีทดลอง

1. วิธีวัดการตกตะกอนของยีสต์

1.1 วัดความดูดกลืนแสง (absorbance measurement)

การวัด optical density หรือ OD ของตัวอย่าง เริ่มต้นวัดหลังจากเก็บตัวอย่างทันทีและหลังจากตั้งตัวอย่างไว้เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

1.2 วัดปริมาณตะกอน (sedimentation test)

นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับร้อยละ 5 ของน้ำหนัก เติม acetate buffer (Helm และคณะ, 1953) 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำสารละลายที่ผสมแล้วนี้ 10 มิลลิลิตรใส่ลงใน กระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ บันทึกปริมาตรของเซลล์ที่ตกตะกอนที่ก้นของกระบอกตวง เมื่อถึงเวลา 1, 5, 10,15 และ 60 นาที

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้แล็คโทสเป็น substrate และสามารถตกตะกอนได้เอง

ยีสต์ทุกสายพันธุ์นำไปเลี้ยงใน semi-defined lactose medium โดยวิธี shake flask ซึ่งอบเพาะเชื้อที่ 37° ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า ยีสต์ Kluyveromyces marxianus สายพันธุ์ y42 และ y610 สามารถตกตะกอนได้เอง ซึ่งทราบได้จากผลของการดูดกลืนแสง และวิธีวัดปริมาณตะกอน ส่วนยีสต์สายพันธุ์อื่นไม่พบการตกตะกอนโดยวิธีวัดปริมาณตะกอน สำหรับยีสต์สายพันธุ์ 102 และ 1496 พบว่ามีค่า OD ต่ำกว่า 1 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ทั้งสองนี้อาจจะตกตะกอนได้เองแต่ช้ามาก จึงสังเกตไม่พบโดยวิธีวัดปริมาณตะกอน

สำหรับคุณสมบัติอื่น ๆ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของยีสต์ทั้ง 8 สายพันธุ์แตกต่างกันไม่มากนักคือ อยู่ระหว่าง

4.60 ถึง 4.89 แต่ความเข้มข้นของ biomass มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 1.40 กรัมต่อลิตรของยีสต์สายพันธุ์ TC 2 จนถึง 3.42 กรัมต่อลิตรของสายพันธุ์ 102

จากผลการทดลองข้างต้นมียีสต์ที่เลือกมาใช้ในการทดลองต่อไปคือ Kluyveromyces marxianus สายพันธุ์ y42, 102, y610 และ 1496 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ตกตะกอนได้ดี สำหรับวิธีทดสอบการตกตะกอน ใช้วิธีวัดปริมาณตะกอน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 จากตารางพบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถตกตะกอนได้ และพบว่าสายพันธุ์ y42 และ y610 ตกตะกอนได้ดีกว่าอีก 2 สายพันธุ์ การทดลองต่อไปจึงเลือกเอายีสต์สายพันธุ์ y42 ไปทดสอบ เนื่องจากยีสต์สายพันธ์นี้ตกตะกอนได้ดี แล้วยังได้มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ y610 อีกด้วย

ตารางที่ 1 คุณสมบัติต่าง ๆ ของยีสต์ 8 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงใน semi–defined lactose medium

Strains	Y42	102	Y113	Y610	1496	TC–2	Ti	sf100
pH	4.60	4.77	4.73	4.65	4.82	4.72	4.89	4.77
DW (g/l)	2.69	3.42	2.95	3.09	2.49	1.40	2.29	2.70
Floc test (ml) ★	0.5	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OD_1	0.255	1.232	1.230	0.107	0.695	1.455	1.811	1.575
OD_2	0.252	0.936	1.148	0.163	0.603	1.400	1.820	1.541
Lactose (g/l)	0.11	0.12	0.12	0.14	0.12	0.14	0.14	0.14
EtOH (g/l)	10.45	7.85	8.81	7.78	10.00	8.75	8.96	5.19

DW = Dry Weight

OD_1 = OD measured immediately after taking culture

OD_2 = OD measured after leaving the culture in a cuvette for 15 minutes

★ = Measure the sediment deposit at 15 minutes after transferring to the cylinder

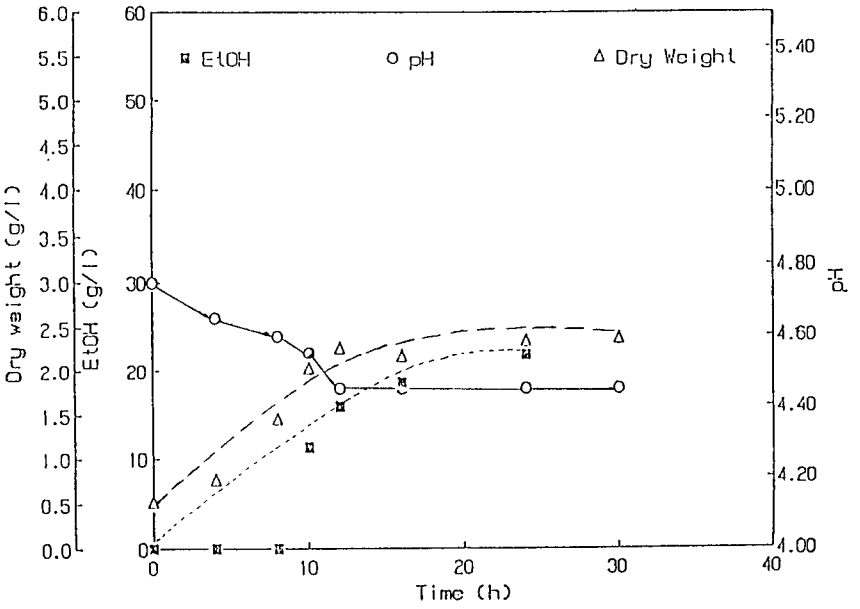
2. การหมักแบบ batch ของยีสต์สายพันธุ์ y42

จุดมุ่งหมายของการทดลองนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการตกตะกอน และการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์สายพันธุ์ y42 เมื่อเลี้ยงในถังหมัก (fermentor) ขนาด 2 ลิตร โดยใช้ supplemented whey permeate medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรูปที่ 1 พบว่าความเข้มข้นของ biomass เริ่มจาก 0.51 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นจนถึง 2.40 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง สำหรับความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์นี้สูงถึง 21.74 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับร้อยละ 85 ของทฤษฎี ส่วนการตกตะกอนก็พบตลอดเวลาที่ทดลอง

ตัวอย่างที่ 2 ผลการตกตะกอนของยีสต์ 4 สายพันธุ์

Floc test	Y42 (ml)	102 (ml)	Y610 (ml)	1496 (ml)
1 min	0.0	0.0	0.0	0.0
5 min	0.2	0.0	0.2	0.0
10 min	0.8	0.0	0.8	0.0
15 min	1.0	0.6	0.9	0.0
60 min	0.8	0.7	0.7	0.7

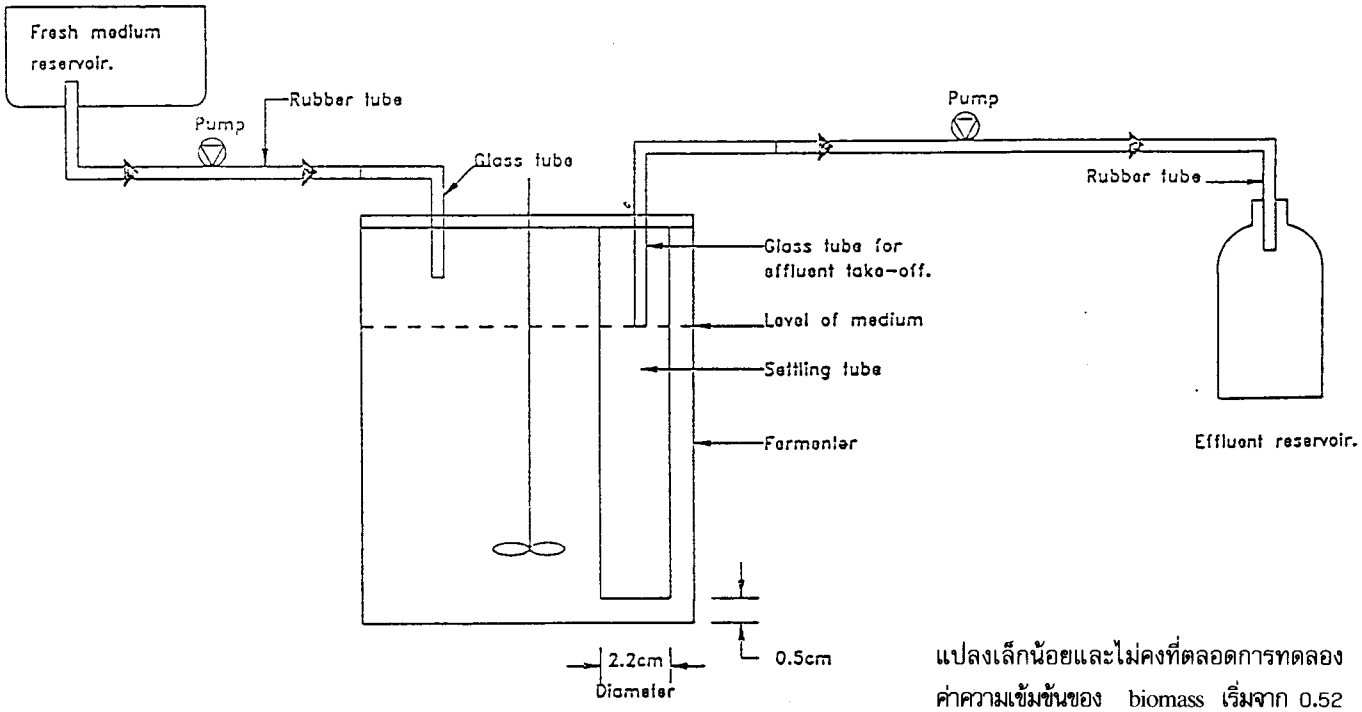


รูปที่ 1 คุณสมบัติต่าง ๆ ของยีสต์ y42 เมื่อหมักแบบ batch โดยใช้ supplemented whey permeate medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การหมักแบบต่อเนื่องของยีสต์ y42

การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการตกตะกอนและการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์สายพันธุ์ y42 โดยวิธีหมักแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งมี internal settling tube เป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ standard whey permeate medium ที่มีแล็คโทสอยู่ 50 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.05 ต่อชั่วโมง และอัตราเร็วเท่ากับ 0.06 ลิตรต่อชั่วโมง

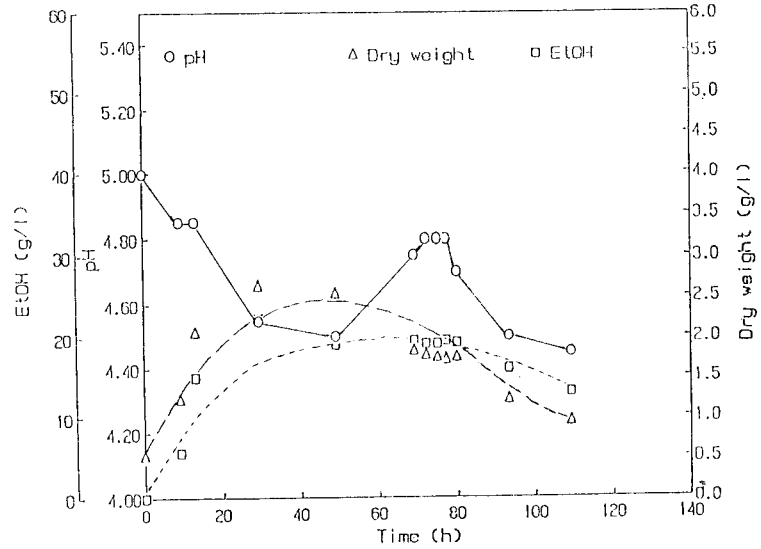
การทดลองนี้เริ่มต้นโดยการหมักแบบ batch เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วง exponential phase ของการเจริญการยีสต์ y42 จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมใหม่ ๆ เข้าไปในถังหมักด้วยอัตราเร็ว 0.06 ลิตรต่อชั่วโมงการหมักแบบต่อเนื่องก็เริ่มขึ้น ในรูปที่ 3 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและไม่คงที่ตลอดการทดลอง ค่าความเข้มข้นของ biomass เริ่มจาก 0.52 กรัมต่อลิตรและสูงสุดเมื่อเวลา 29 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ 2.63 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น biomass ก็ลดลงเรื่อยจนมีค่าเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรเมื่อหมักไปแล้ว 109 ชั่วโมง ในทำนองเดียวกันความเข้มข้นของเอทานอล



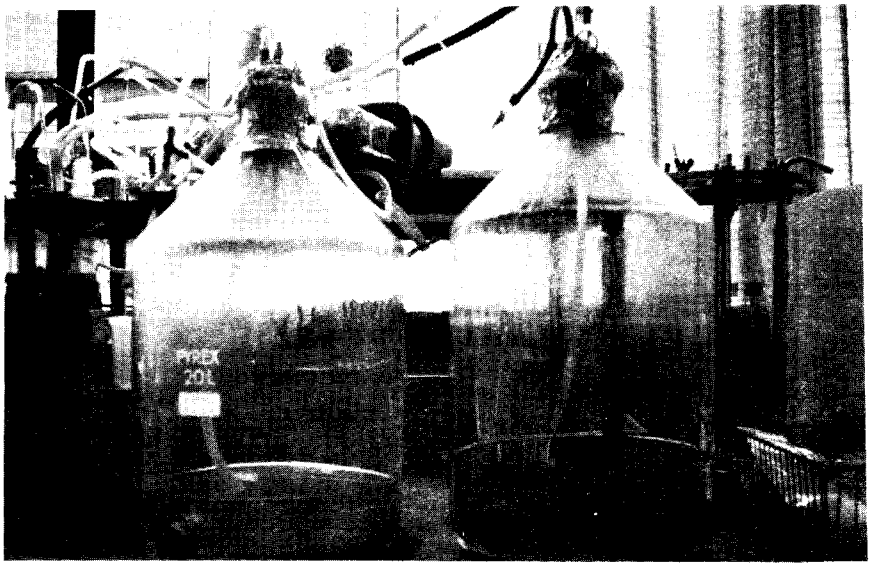
รูปที่ 2 แบบจำลอง fermentor ขนาด 2 ลิตร ซึ่งมี internal settling tube ใช้สำหรับการหมักแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่อง

สูงสุดเมื่อเวลา 29 ชั่วโมงซึ่งเท่ากับ 22.24 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 87 ของทฤษฎี) จากนั้นความเข้มข้นจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึง 13.05 กรัมต่อลิตร หลังจากเวลาผ่านไป 109 ชั่วโมง สำหรับคุณสมบัติในการตกตะกอนนี้ไม่ได้ติดตามผล

การทดลองครั้งนี้ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากยีสต์ได้สูญเสียไประหว่างการหมักและแอลกอฮอล์ที่ได้จากการผลิตมีปริมาณน้อย สาเหตุอาจเนื่องมาจากเซลล์ยีสต์ไม่ตกตะกอนในระหว่างการทดลองและอาจถูกล้างไปพร้อมกับแอลกอฮอล์ ดังนั้นการปรับสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะต่อการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์นี้จึงต้องศึกษาต่อไป โดยการเติม Ca^{2+} และ K^{+} ซึ่งมีรายงานว่ามีความสำคัญต่อการตกตะกอนของยีสต์บางสายพันธุ์ (Amri และคณะ, 1979 และ Love, 1987)



รูปที่ 3 คุณสมบัติต่าง ๆ ของยีสต์ y42 เมื่อหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ standard whey permeate medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ



การหมักแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่อง

4. การศึกษาอิทธิพลของ Ca^{2+} และ K^{+}ต่อการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์ y42

การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อที่จะหาความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง Ca^{2+} และ K^{+} ต่อการตกตะกอนของยีสต์ y42 ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 1.5, 15 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ K^{+} ที่ใช้เท่ากับ 10,100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

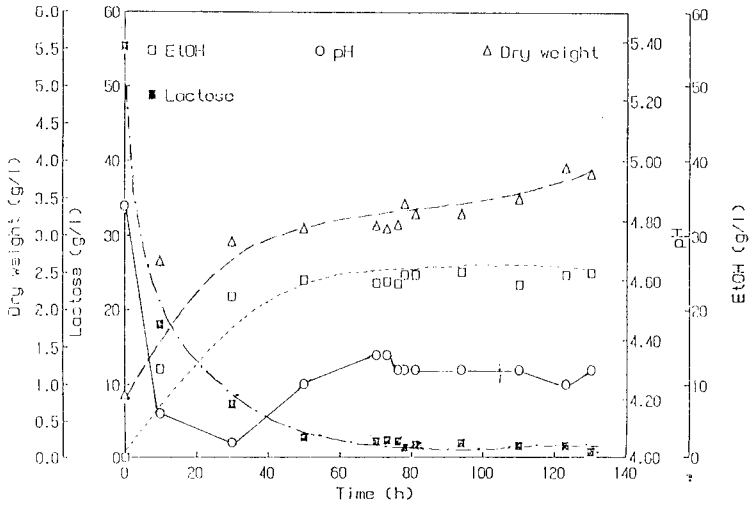
ผลการทดลองดังในตารางที่ 3 พบว่ามียีสต์นี้ตกตะกอนได้มากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรของ K^{+} ใน trial ที่ 4 ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะเป็น demineralized whey permeate medium โดยเติม Ca^{2+} และ K^{+} ในความเข้มข้นที่เหมาะสม

5. การหมักแบบต่อเนื่องของยีสต์สายพันธุ์ y42 โดยใช้ supplemented demineralized whey permeate เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะให้มียีสต์สายพันธุ์ y42 ตกตะกอนได้ดีที่สุดและผลิตเอทานอลได้สูงสุด อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ demineralized whey permeate medium ซึ่งเติม yeast extract 5 กรัมต่อลิตร Ca^{2+} 15 มิลลิกรัมต่อลิตร และ K^{+} 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการควบคุมอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.05 ต่อชั่วโมง และอัตราเร็วเท่ากับ 0.075 ลิตรต่อชั่วโมง การทดลองเริ่มต้นโดยการหมักแบบ batch เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อก็จะถูกปล่อยเข้าไปในถังหมัก การหมักแบบต่อเนื่องก็จะเริ่มขึ้น

ตารางที่ 3 ผลการทดลองการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์ y42 เมื่อใช้ combination ของ Ca^{2+} และ K^+ ต่าง ๆ กันครั้งที่ 2

Trial	Ca^{2+} mg/l	K^+ mg/l	Floc test (ml) 1 min	5 min	10 min	15 min	60 min
1	1.5	10	0.0	0.0	0.4	0.8	0.8
2	1.5	100	0.0	0.0	0.3	0.6	0.6
3	1.5	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
4	15	10	0.0	0.6	1.0	1.0	0.8
5	15	100	0.0	0.2	0.7	0.8	0.7
6	15	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
7	150	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
8	150	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
9	150	1000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1



รูปที่ 4 คุณสมบัติต่าง ๆ ของยีสต์ y42 เมื่อหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้ Supplemented demineralized whey permeate medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรูปที่ 4 พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.85 และเมื่อการหมักผ่านไป pH จะอยู่ระหว่าง 4.05 - 4.40 หลังจากนั้น pH ก็จะคงที่เมื่อการหมักผ่านไป 50 ชั่วโมง และมีการเปลี่ยนแปลงของ pH เล็กน้อยซึ่งอยู่ระหว่าง 4.25 - 4.35 จนสิ้นสุดการทดลอง สำหรับค่าความเข้มข้นของ biomass เริ่มจาก 0.85 กรัมต่อลิตร และเพิ่มจนถึง 3.08 กรัมต่อลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 50 ชั่วโมง ในช่วงแรก biomass จะคงที่ แต่ต่อมา biomass ก็เพิ่มขึ้นจนสูงถึง 3.89 กรัมต่อลิตรหลังจากการหมักผ่านไป 123 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์นี้ตลอดระยะเวลาทดลอง การเพิ่มขึ้นของ biomass ช่วยให้เซลล์ยีสต์ในถังหมักมีมากขึ้น เนื่องจากการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์นั่นเอง

สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ในการทดลองนี้นับว่าเป็นที่น่าพอใจ ความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ระหว่าง 23.3 - 25.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการทดลองครั้งก่อน ๆ ผลผลิตที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.47 หรือคิดเป็นร้อยละ 92 ของทฤษฎี

สรุป

จากการศึกษาทดลองคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า Kluyveromyces marxianus สายพันธุ์ y42 มีคุณสมบัติเหมาะสำหรับใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์จาก whey ซึ่งการทดลองผลิตแอลกอฮอล์แบบ batch ของยีสต์ y42 โดยใช้ Supplemented whey permeate medium สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 22 กรัมต่อลิตรจากแล็คโทส 50 กรัมต่อลิตร

คุณสมบัติในการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์ y42 พบได้ตลอดการทดลองถึงแม้ว่าสภาวะต่าง ๆ จะเปลี่ยนแปลงไป การตกตะกอนพบทั้งในการทดลองแบบ shake flask แบบ batch และการหมักแบบต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบตะกอนเมื่อยีสต์เจริญในsemidefined medium ใน standard whey permeate medium ใน supplemented whey permeate medium หรือใน supplemented demineralized whey permeate medium จากผลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ยีสต์สายพันธุ์ y42 มีคุณสมบัติในการตกตะกอนที่ดี ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า Ca^{2+} และ K^+ ช่วยในการตกตะกอนของยีสต์สายพันธุ์ y42 สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Ca^{2+} และ K^+

(อ่านต่อหน้า 6)

วิธี Fire assay and cupellation ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น แม้จะยุ่งยาก แต่ก็เป็นวิธีวิเคราะห์ทองปริมาณสูงที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีวิธีทางเคมีอื่น ๆ อีกเช่น การตกตะกอนเป็นโลหะทองด้วยสารเคมีที่เป็น reducing agent เช่น sulphur dioxide, Oxalic acid, Iron (II) sulphate และ Hydroquinone ด้วยวิธีเหล่านี้ต้องทำตัวอย่างทองให้อยู่ในรูปของสารละลาย โดยการละลายในกรดกัดทอง ปรับภาวะให้เหมาะสมสำหรับสารเคมีชนิดที่ต้องการใช้ สารเคมีนั้นจะทำให้ทองในสารละลายตกตะกอนเป็นผงโลหะทองสีเหลือง-น้ำตาล กรองตะกอนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เผาตะกอนและกระดาษกรองให้ไหม้ก่อน แล้วจึงเผาที่อุณหภูมิ 700 ° ซ. 1 ชม. จะได้โลหะทองบริสุทธิ์สีเหลืองสุกใส

นอกจากวิธีเคมีดังกล่าวแล้วยังมีวิธีวิเคราะห์ทองโดยใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น X-ray diffraction, Emission Spectrometer เครื่องมือทั้ง 2 นี้สามารถวิเคราะห์ได้โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง ส่วนเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer เหมาะสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณทองน้อย ๆ โดยต้องทำตัวอย่างให้เป็นสารละลายก่อนแล้วจึงวัดหาปริมาณทอง เทียบกับสารละลายทองมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว

กรมวิทยาศาสตร์บริการ ให้บริการการวิเคราะห์ปริมาณทองคำในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ ทั้งทองรูปพรรณ เครื่องราชอิสริยาภรณ์ เหรียญทอง และทองผสมอื่น ๆ โดยวิธี Fire assay and cupellation และใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer ผู้สนใจสอบถามรายละเอียดเพิ่มเติมได้ที่ กองเคมี กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

เอกสารอ้างอิง

1. Snell, Foster Dee and Eltre, Leslie S. **Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis** vol. 14, (N.Y.) : 1971, p. 1-49
2. Hawley, Gressner G. **The Condensed Chemical Dictionary** (N.Y.) : Van Nostrand Renhold Company, 1981, p.506-507
3. **Method for determination of gold and silver in ores** Japanese Industrial Standard Committee. JIS M8111-1963 Japan : JIS, 1963. JIS M8115-1950 (Reaffirmed : 1978) Determination of gold and silver in crude bullion.
4. **Method for assaying of gold and gold alloys.** Indian Standard Committee. IS : 1418-1962 India : IS, 1962
5. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมทองรูปพรรณ** สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม มอก. 303-2522

การผลิตแอลกอฮอล์จาก whey ฯ (ต่อจากหน้า 11)

15 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

การผลิตแอลกอฮอล์แบบต่อเนื่องในถังหมักที่มี internal settling tube เป็นองค์ประกอบโดยใช้ Standard whey permeate medium ไม่ทำให้ biomass ของยีสต์เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากอัตราส่วนความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ K^{+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เหมาะสม ส่วนการทดลองโดยใช้ demineralized whey permeate ที่เติม Ca^{2+} และ K^{+} ในปริมาณพอเหมาะ ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ

การทดลองครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับงานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการนำเอาผลิตภัณฑ์เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และมีค่ามากขึ้น โดยการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมรวมกับกระบวนการหมักทางเทคโนโลยีชีวภาพและหาแนวทางเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Amri, MA., R.Bonaly, B.Duteurtre, and M.Moll. Interrelation beteween Ca^{2+} and K^{+} ions in the flocculation of two Brewers yeast strains. **European Journal of Applied Microbioloy and Biotechnoloyg,** 1979, vol 7 : p.235-240
2. Helm, E., B. Nohr, and R.S.W. Thorne. **The Measurement of yeast flocculence and its significance in brewing.** Wallerstein Laboratorise Communications. 1953, vol. 16., no. 55, p.315-325
3. Love, DC. 1987. **Flocculation of kluyveromyces marxianus for the whey to ethanol fermentation.** Research project fourth year student. massey University, Palmerston North. New Zealand.