

糸狀菌에 의한 枸橼酸醱酵에 관한 研究

(第Ⅳ報) 可溶性澱粉 및 糖蜜에 의한 枸橼酸醱酵

成洛癸 · 金明燦 · 沈奇煥 · 鄭德和

慶尙大學校 農科大學 食品加工學科

Studies on the Citric Acid Fermentation with Fungi

(Pars IV) Citric Acid Fermentation from Soluble Starch and Molasses

Nack Kie Sung, Myung Chan Kim, Ki Hwan Shim, Duck Hoa Chung

Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture,

Gyeong Sang National University, Jinju, Korea

Abstract

Some experiments on the citric acid production were carried out from soluble starch and molasses as raw materials.

When soluble starch was used as substrate for the fermentation of citric acid by the strain M-80 which had assimilating ability of soluble starch in surface culture, the optimal culture media was 120g of soluble starch, 3.0g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0g of KH_2PO_4 , 0.2g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5mg of Fe^{++} , 1mg of Zn^{++} and 20ml of methanol were added to 1 liter and optimal pH was 5.5. In about 8 days 61.8mg/ml of citric acid was produced.

When treated molasses with potassium ferrocyanide was used as substrate for the fermentation of citric acid by the strain of M-315, the optimal condition in surface culture was 250g of molasses, 0.3g of NH_4NO_3 , 0.05g of KH_2PO_4 , 0.01g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g of potassium ferrocyanide and 30ml of methanol were added to 1.0 liter. On the other hand, the optimal condition in submerged culture was 250g of molasses, 0.3g of NH_4NO_3 , 0.1g of KH_2PO_4 , 0.01g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g of potassium ferrocyanide, and 30ml of methanol were added to 1.0 liter and optimal pH was all 5.0. After 9 days culture, 69.4mg/ml, 39.6mg/ml of citric acid were separately produced in surface and submerged culture media.

緒 論

TCAcycle 이 생세포에 의한 당의 호기적 주경로의 하나로서 발견된 후, 세포대사의 관련물질로서 구연산의 중요성이 크게 인정되었다. 구연산은 파인애플, 柑橘 등의 과실에서 얻어진 천연 구연산으로부터 각종 미생물이 당류를 발효하여 集積된 구연산에 이르기까지 그 生産源은 다양하다. 구연산 발효에 있어서 工業的 生産費에 주는 것은 발효

기질로 사용되는 탄수화물의 수급이다.

sucrose 대신 粗炭水化物原料를 사용할 경우 배지의 무기염조성의 조절이 곤란하게 되는데 일찌기 Chughtai 등¹⁾은 당밀중의 중금속을 제거하기 위하여 원료를 전처리하거나 生酸促進劑를 첨가하였다. Martin 등²⁾은 ferrocyan 화합물로 전처리한 사탕무우당밀배지를 tower-type 발효조에 넣어 처음 24시간 격렬한 공기통기를 한 후 다시 격렬한 산소통기를 행하여 72시간 배양한 결과 좋은 수율을

올렸다.

발효기질의 전처리과정에서 ferrocyan 화합물로서 금속이온을 chelate 시키는 것과 이온교환수지 등을 처리하는 방법이 있는데 최근에는 aconitase 에만 선택적으로 유효하게 작용하는 inhibitor 인 monofluoroacetic acid 감수성균을 유도하여 isocitric acid의 부생을 억제하려고 시도하고 있다. 최근 Macris³⁾는 새로운 발효기질로서 carob tree pod로부터 얻은 fructoline을 탄소원으로 하여 배양시킨 결과 65.8%의 당을 소비하여 59.4%의 수율을 얻었다고 한다. 저자 등은 전보⁴⁾에서 분리한 균으로써 가용성전분 및 당밀을 기질로 하여 구연산생성에 관한 몇가지 실험을 하여 그 결과를 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 使用菌株

전보⁴⁾에서 분리동정한 M-80 (*Aspergillus usamii* mut. *shirousamii*)과 M-315 (*Aspergillus niger*)를 공시균으로 실험에 사용하였다.

2. 培養方法

1) 前培養

표면배양시는 stockculture 상의 공시균을 포자형성배지에 접종하여 7일간 사면배양하여 사용하였고, 액내배양시는 포자형성배지에 사면배양되어 있는 균의 포자현탁액을 기본배지 50ml가 들어있는 500ml 진탕플라스크에 넣어 36시간 동안 seed culture를 행한 후 그 액 1ml씩을 접종하였다.

2) 可溶性澱粉을 이용한 培養

가용성전분의 이용성을 알아보기 위하여 Table 1과 같은 조성의 기본배지가 50ml씩 들어있는 250ml 삼각플라스크에 공시균(M-80)을 접종한 후 28~30°C에서 8일간 배양하면서 여러가지 발효조건을 검토하였다.

Table 1. Composition of basal medium on citric acid fermentation from soluble starch.

Sucrose	140g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3g
KH ₂ PO ₄	1.5g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25g
Fe ⁺⁺	3.0mg
Zn ⁺⁺	1.0mg
D. W.	1l
Initial pH	5.0

3) 糖蜜을 이용한 培養

분리균 M-315를 이용하여 표면 및 액내배양을 병행하여 당밀을 발효기질로 하였을 때의 구연산 발효조건을 검토하였다.

표면배양은 sucrose 사용 시와 동일하게 250ml 삼각플라스크에 살균한 Table 2의 기본배지 50ml씩을 넣고 공시균(M-315)을 접종하여 8일간 배양하였으며, 액내배양도 전기의 액내배양과 동일하게 9일간 배양하였다.

3. 培養物의 分析法

배양액 속의 총산, 구연산 및 기타성분의 분석은 전보⁴⁾에 따랐다.

實驗結果 및 考察

1. 可溶性澱粉을 이용한 枸橼酸醱酵

구연산발효에 관한 연구로서는 sucrose나 당밀을 원료로 한 것이 대부분을 차지하고 있으며 전분질을 원료로 한 보문은 일부에 지나지 않는다⁵⁾.

균의 발육은 maltose > dextrine > glucose > 가용성전분, 酸生成은 glucose > maltose > dextrine > 가용성전분의 순인데, 여러가지 전분질원료를 구연산 발효에 이용할 수 있게 하기 위하여 산당화법과 같은 인위적방법에 의하여 미생물이 이용할 수 있는 형태의 물질로 바꾸어 주는 작용이 필요하다.

본 실험에서는 전보⁴⁾에서 언급한 바와 같이 분리균 M-80이 내산성 amylase를 강력하게 분비하므로써 전분을 잘 당화하며, 또한 유기산생성능이 강한 것을 참고로 하여 전분질원료를 산당화하기에 앞서 정제한 가용성전분을 발효기질로 하여 표면배양을 행하였다.

1) 可溶性澱粉濃度

기본배지의 탄소원 대신 가용성전분을 5~20%까지 농도별로 첨가하여 발효배지를 만든 후 250ml 삼각플라스크에 50ml씩 넣어 상법으로 살균하여 접종한 후 7일간 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 가용성전분농도가 높을수록 구연산 생성량은 증가하였으나 원료에 대한 수율은 12% 첨

Table 2. Composition of basal medium on citric acid fermentation from molasses

Molasses	200g
NH ₄ NO ₃	0.6g
KH ₂ PO ₄	0.1g
D. W.	1l
pH	4.5

Table 3. Effect of soluble starch concentration on citric acid fermentation

Conc. (%)	Citric acid (mg/ml)	pH	sporulation ratio on mat (%)	Yield. (%)
5	14.3	2.05	100	28.7
10	36.4	1.91	100	36.4
12	48.6	1.86	90	40.5
14	54.4	1.90	70	28.8
16	60.2	1.79	100	37.6
18	63.7	1.82	100	35.4
20	67.9	1.85	100	33.9

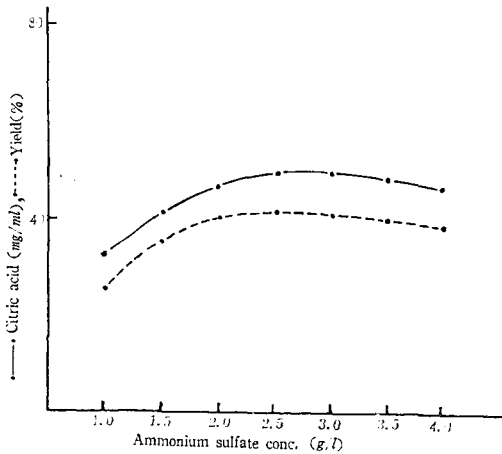


Fig. 1. Effect of ammonium sulfate concentration on citric acid fermentation.

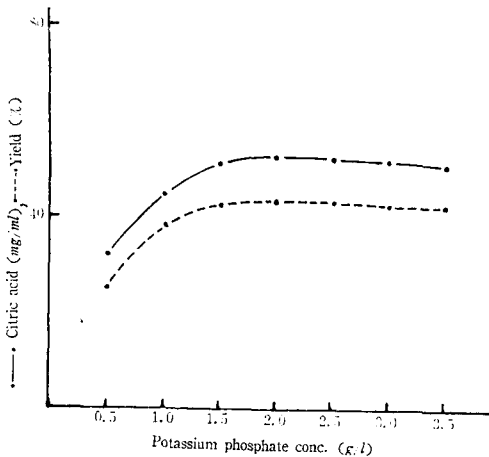


Fig. 2. Effect of potassium phosphate concentration on citric acid fermentation.

가구에서 가장 좋았다.

2) 各種 無機鹽 添加의 영향

가용성전분을 발효기질로 하였을 때 분리균의 구연산 생성에 적당한 무기염 농도를 조사하였다. 즉 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 0~0.4% 첨가하여 실험한 결과 0.25% 첨가하였을 때 41.2%로서 가장 좋은 수율을 나타내었다.

또한 KH_2PO_4 의 첨가량을 검토한 결과(Fig. 2)는 0.2% 첨가하였을 때가 가장 좋았으며 尾崎等⁵⁾은 소맥정제전분을 사용하였을 때 K_2CO_3 와 H_3PO_4 로써 K, P의 적정농도를 구한 결과 K는 0.015~0.035%, P는 0.013~0.026% 였다고 하였다.

또 Fig. 3에서 보는 바와 같이 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 요구량을 구한 결과 0.02% 첨가하였을 때 가장 좋았다.

한편 Doelger等⁶⁾은 *Aspergillus niger*를 사용한

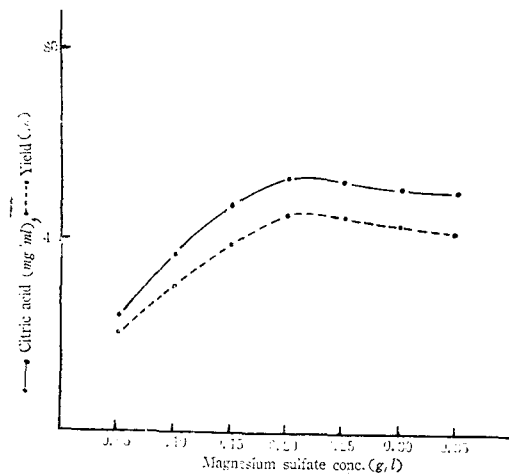


Fig. 3. Effect of magnesium sulfate concentration on citric acid fermentation.

Table 4. Effect of initial pH on citric acid fermentation.

Initial pH	Citric acid (mg/ml)	pH	Sporulation rate on mat (%)	Yield (%)
2	38.4	2.01	0	32.0
3	40.4	1.87	0	73.7
4	43.2	2.00	50	36.0
4.5	51.7	1.98	50	43.1
5	52.9	1.92	75	44.1
5.5	54.9	1.89	100	45.8
6	53.7	1.92	100	44.8
7	53.8	1.95	100	44.9

표면배양에서 0.023%의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가하는 것이 적당하다고 하였으며 Johnson 등⁷⁾도 액내배양에서 0.25%의 KH_2PO_4 와 0.02%의 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 효과적이라고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 거의 일치하였다.

3) 最適 pH

앞에서 구한 최적 무기염 농도하에서 배양액의 pH를 0.5N HCl, 0.5N NaOH로써 pH 2-8로 조절하여 최적 pH를 조사한 결과 Table 4에서 보는 바와같이 대체로 pH 3.0 이하에서는 포자형성이 불량한 반면 pH 5.0 이상에서는 포자형성이 좋았고 산생성은 pH 5.5에서 45.8%로서 가장 좋았다.

4) 微量金屬 添加影響

사용균주의 미량금속 요구도를 알아보기 위하여 sucrose를 기질로 하였을 때와 같은 방법⁸⁾으로 Fe^{++}

및 Zn^{++} 을 0~3mg/l, 0~5mg/l 첨가하여 본 결과 각각 1.5mg/l 및 1.0mg/l 첨가하였을 때 약간의 효과를 보였다. 그런데 요구량이 Zn^{++} 은 sucrose 사용 시와 비슷했으나 Fe^{++} 는 3.0mg/l 보다 적었는데 이는 가용성전분 속에 Fe^{++} 가 소량 함유되어있기 때문이라 생각된다.

5) NaF 및 methanol 添加效果

sucrose를 기질로 사용하였을 때 분리균 M-80의 구연산생성에 약한 촉진효과를 보였던 NaF 및 methanol을 사용하여 그 영향을 실험한 결과(Table 6) NaF는 1.0mg/l 첨가하였을 때 49.6%로서 약간의 증가가 있었으며 그이상 첨가하였을 때는 포자형성율이 저하됨과 동시에 酸生成도 감소되었다. Methanol도 sucrose첨가 시와 비슷한 경향을 보여 51.5%의 수율을 얻을 수 있었으나 과량 첨가한

Table 5. Effect of metallic ions on citric acid fermentation

Metallic ions (mg/l)	Concentration (mg/l)	Citric acid (mg/ml)	pH	Sporulation rate on mat (%)	Yield (%)
Fe^{++}	0	49.8	1.97	100	41.5
	0.5	49.2	1.92	100	41.0
	1.0	54.1	1.87	100	45.1
	1.5	57.4	1.95	100	47.9
	2.0	56.7	1.91	100	47.3
	2.5	55.3	1.89	100	46.0
	3.0	54.9	1.89	100	45.8
Zn^{++}	0	57.2	1.87	100	47.7
	0.5	57.6	1.91	100	48.0
	1.0	58.7	1.88	100	48.9
	2.0	56.2	1.88	100	46.9
	3.0	55.4	1.92	100	46.2
	4.0	52.7	1.95	100	43.9
	5.0	48.9	1.91	100	40.8

Table 6. Effect of NaF or methanol on citric acid fermentation

Reagent	Concentration (mg/l)	Citric acid (mg/ml)	pH	Sporulation rate on mat (%)	Yield (%)
NaF	0	57.8	1.96	100	48.2
	0.5	58.3	2.01	100	48.6
	1.0	59.5	1.97	100	49.6
	5.0	52.4	1.89	50	43.7
	10.0	55.1	1.91	50	37.6
	50.0	17.3	1.92	30	14.4
Metanol	0(%)	58.7	1.87	100	48.9
	1	60.1	1.92	100	50.1
	2	61.8	1.88	50	51.5
	3	58.4	1.87	20	48.7
	4	48.6	1.91	0	40.5
	5	35.0	1.93	0	29.2
	6	15.0	1.90	0	12.6

경우에는 사용균의 발육 및 生酸이 급격한 저해현상을 보였다.

2. 糖蜜을 이용한 枸橼酸醱酵

구연산 제조원료로서 널리 이용되고 있는 당밀에는 beet molasses, cane black molasses, cane invert molasses 등이 있는데 그중 beet molasses가 그 대부분을 이루고 있다.

저자 등도 펠리핀산 당밀을 원료로 하여 분리균 M-315에 의해 표면 및 액내배양을 병행하면서 구연산발효의 여러가지 조건을 검토하였는데 사용된 당밀의 화학적조성은 환원당 25.1%, 총당 54.7%, 회분 4.2%였다.

1) 糖蜜의 濃度

당밀 100~500g/l을 농도별로 첨가하고 상법으로 살균하여 공시균을 접종한 후 표면 및 액내배양을 9일간 실시한 결과 (Table 7) 모두 250g/l

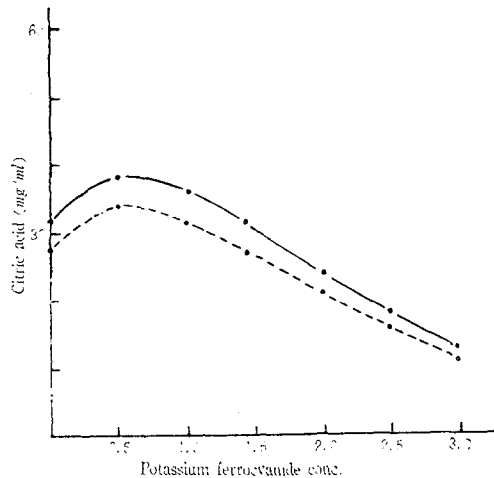


Fig. 4. Effect of potassium ferrocyanide used for molasses treatment.

--- Surface culture

..... Submerged culture

Table 7. Effect of initial concentration of molasses on citric acid fermentation

Cultural method Conc. of molasses (g)	Titrable acid		Citric acid (mg/ml)		Yield (%)	
	surface	submerged	surface	submerged	surface	submerged
100	0.8	0.8	4.7	5.6	8.8	10.4
150	1.6	2.0	11.0	13.1	13.2	16.7
200	2.4	2.6	15.9	17.2	14.7	15.9
250	4.6	3.6	31.5	26.5	23.3	19.6
300	5.0	4.2	34.1	28.8	20.7	17.7
350	5.8	4.4	39.9	30.1	21.1	15.8
400	6.0	5.0	41.2	34.0	19.0	15.7

Table 8. Effect of concentration of inorganic salts on citric acid fermentation

Inorganic salt	Method of exp. Conc (g/l)	Crtric acid (mg/ml)		Yield (%)	
		Surface culture	Submerged culture	Surface culture	Submerged culture
NH ₄ NO ₃	0	36.2	30.9	26.0	22.9
	0.3	38.7	33.5	28.7	24.8
	0.6	37.8	32.6	28.0	24.1
	0.9	35.9	32.1	26.6	23.8
	1.2	35.8	31.6	26.5	23.4
	1.5	35.2	31.2	26.0	23.1
	1.8	34.1	30.5	25.2	22.6
	2.1	35.0	30.4	25.9	22.5
KH ₂ PO ₄	0	37.9	30.4	28.1	22.5
	0.05	40.4	32.8	29.9	24.3
	0.1	38.5	33.8	28.7	25.0
	0.2	38.2	33.4	28.3	24.7
	0.3	35.8	32.7	26.5	24.2
	0.4	36.4	32.1	26.9	23.9
	0.5	36.1	31.8	26.7	23.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0	39.7	33.7	29.4	24.9
	0.01	41.2	34.0	30.5	25.2
	0.02	39.8	32.0	26.5	23.7
	0.03	37.8	30.9	28.0	22.9
	0.04	38.9	28.8	28.0	21.4
	0.05	36.6	28.1	27.1	20.8

첨가하였을 때 가장 좋았다.

2) 黃血鹽 添加效果

당밀을 발효기질로 사용할 경우 원료를 전처리 하는 데는 황혈염법, 적혈염법 및 이온교환수지법 등이 있는데 이중 황혈염법은 Fe[#] 감소에 효과가 있는데, Perlman 등⁹⁾도 甘蔗糖蜜에 이 방법을 이용하여 좋은 효과를 보았으며 저자 등도 배양액을 개선할 목적으로 기본배지를 살균하여 당밀 250g 에 대해 황혈염 0~3g을 첨가하여 본 결과 Fig. 4 에서 보는 바와 같이 대체로 0.5g 첨가하므로써 좋은 효과를 나타내었으며 표면배양의 경우 4.2%, 액내배양에서 5.2%의 수율향상이 있었다.

최근 Qadeer 등¹⁰⁾은 5~200ppm의 황혈염을 첨가하여 액내배양을 시켰을 경우 10~30ppm에서 많은 구연산을 생산하였으나 첨가량이 많으면 오히려 균체생육, 산생성, 당 이용율등이 모두 감소한다고 하였다.

3) 各種 無機鹽 添加 效果

각종무기염을 농도별로 첨가하여 본 결과 Table 8 에서 처럼 NH₄NO₃ 0.3g/l, MgSO₄·7H₂O 0.01g/l

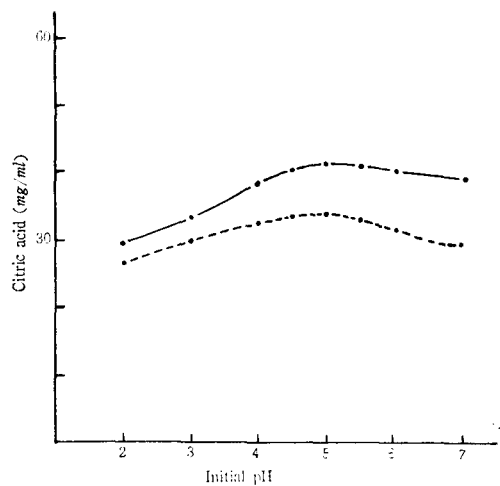


Fig. 5. Effect of initial pH on citric acid fermentation

--- Surface culture
 Submerged culture

Table 9. Effect of NaF or methanol on citric acid fermentation

Reagent	Cultural method Concentration	Citric acid (mg/ml)		Yield (%)	
		surface	submerged	surface	submerged
NaF	0 (mg/l)	42.6	34.1	31.5	25.2
	0.5	42.1	33.5	31.1	24.8
	1.0	40.4	34.0	29.9	25.2
	5.0	38.3	28.7	28.4	21.2
	10.0	35.5	23.8	26.3	17.6
	50.0	26.6	18.2	19.7	13.5
Metanol	0 (%)	42.7	32.7	31.3	24.2
	1	43.9	33.9	32.7	25.2
	2	64.9	36.1	48.4	26.9
	3	69.4	39.6	51.4	29.5
	4	65.4	38.9	48.5	29.0
	5	60.7	31.2	45.0	23.2
	6	53.0	22.1	39.3	16.4

첨가하였을 때 표면 및 액내 배양에서 모두 최적을 보였으며 KH_2PO_4 는 표면배양에서는 0.05g/l, 액내배양에서는 0.1g/l 첨가 시에 좋았다. 이와 같이 공시균의 무기염 요구량이 다른 원료를 사용하였을 때보다 적은 것은 당밀 자체에 함유되어 있는 무기염이 이용되었기 때문이라 생각되며 이는 shadafza 등¹¹⁾의 견해와도 일치하고 있다.

4) 初基 pH의 影響

앞에서 얻은 최적조건 하에서 0.5N HCl 및 0.5N NaOH 로써 배양액의 pH를 각각 조절한 다음 표면 및 액내배양을 한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 공시균주의 최적 초기 pH는 5.0으로서 sucrose를 기질로 하였을 때⁸⁾와 비슷하였다.

그런데 Shadafza 등¹¹⁾의 결과에 의하면 최고수율을 나타내는 초기 pH는 5.0~6.5로서 본 실험 결과와 약간 상이한데 이는 기질 자체의 buffer action이 서로 다르기 때문이라 추측된다.

5) 醱酵促進劑의 影響

sucrose를 탄소원으로 사용하였을 때 촉진효과를 보였던 methanol을 0~6%, NaF를 0~50mg/l 적을 당밀배지에 첨가한 결과 (Table 9) NaF는 별 다른 효과가 없었고, methanol은 높은 촉진효과를 보였다. 즉 3%의 methanol을 첨가하였을 경우에는 표면배양에서는 약 20%, 액내배양의 경우에는 약 5%의 수율이 향상되었다.

한편 Krishan 등¹²⁾은 *Aspergillus niger*를 cane juice가 함유된 배지에서 발효시킬 때 methanol을 3% 첨가함으로써 15~17%에서 40~42%로 수율

이 향상되었으며 팜공 oil을 첨가하였을 경우는 35~37%까지 수율이 향상되었다고 보고하였으며, Hang¹³⁾등은 brewery waste를 구연산발효에 사용할 경우 methanol을 2~4% 첨가함으로써 현저한 효과를 나타낸다고 보고 하였다. 이와 같이 methanol을 발효배지에 첨가함으로써 수율이 향상되는 것은 균주가 각종 저해물질에 대한 내성이 증가되고 이들 물질에 의한 저해작용의 감소로 수율이 향상되는 것으로 생각되어지는데 이 문제에 대해서는 계속 연구해 나갈 예정이다.

要 約

전보에서 분리한 균을 사용하여 당밀과 가용성 전분을 발효기질로써 구연산생성에 관한 몇 가지 실험을 한 결과는 다음과 같다.

1) 가용성전분을 기질로 하여 분리균 M-80을 표면배양할 경우 soluble starch 120g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, Fe^{++} 1.5mg, Zn^{++} 1mg, methanol 20ml, D. W. 1l, initial pH 5.0으로 하여 8일간 배양하였을 때 61.8mg/ml의 구연산이 생성되었다.

2) 분리균 M-315를 황철염으로 전처리한 당밀을 기질로 하여 발효조건을 구한 결과, 표면배양은 당밀 250g, NH_4NO_3 0.3g, KH_2PO_4 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, methanol 30ml, D. W. 1l, initial pH 5.0이었고, 액내배양의 경우는 당밀 250g, NH_4NO_3 0.3g, KH_2PO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, methanol 30ml, D. W. 1l, initial pH 5.0이었으며

9 일 배양으로 각각 69.4mg/ml, 39.6mg/ml의 구연산이 생성되었다.

參 考 文 獻

- 1) Chughtai, I.D. and Waker, T.K. : *J. Biochem.*, **56**, 484 (1954).
- 2) Martin, S.W. and Walfers, W.R. : *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 2229 (1952)
- 3) Macris, B. : *J. Biotechnol. Bioeng.*, **17**(9), 1373 (1975).
- 4) 成洛癸, 金明燦, 沈奇煥, 鄭德和 : 韓國産業微生物學會誌, **8** (1), 47 (1980).
- 5) 尾崎淺一郎, 竹下和夫, 渡邊幸雄 : 醱酵協會誌, **13**, 333 (1955).
- 6) Doelger, W.P. and Prescott, S.C. : *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 442 (1934).
- 7) Johnson, M.J. and Shu, P. : *Ind. Eng. Chem.*, **40**, 1202 (1948).
- 8) 成洛癸, 金明燦, 沈奇煥, 鄭德和 : 韓國産業微生物學會誌, **8** (3), (1980).
- 9) Perlman, D., Kita, D.A. and Peterson, W.H. : *Arch. Biochem.*, **11**, 123 (1946).
- 10) Qadeer, M.A., Yasin, M. and Baig, M.A. : *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **12**, 47(1969).
- 11) Shadafza, D., Ogawa, T. and Fazel, A. : *J. Ferment. Technol.*, **54** (2), 67 (1976).
- 12) Krishan, K., Ethiraj, S. : *Int. Sugar, J.*, **78** (13), 725 (1976).
- 13) Hang, Y.D., Splittstoesser, D.F., Woodans, E.E. and Sherman, R.M. : *J. Food Sci.*, **42** (2) 383 (1977).