

# 细菌酒精发酵

章克昌

(教务处)

## 摘 要

本文介绍了发酵运动单胞菌的发现, 该菌的形态、生理特性及其在工农业生产上应用的可能性。重点叙述了国际上利用发酵运动单胞菌进行酒精发酵的各种最新研究。最后对我国开展这方面的研究提出了看法。

本世纪七十年代, 接连发生了两次石油危机, 使西方许多国家认识到利用再生资源生产能源的重要性。发酵酒精作为一种可以全部或部分代替汽油的潜在能源再次得到了科学家的普遍重视。降低发酵酒精生产的能耗、提高发酵罐单位容积的酒精产量和降低成本是各国科学家研究的目标。细菌酒精发酵研究的目的之一就在于探讨用发酵运动单胞菌(*Zymomonas mobilis*)代替酒精酵母并达到上述诸目的的可能性。利用耐热梭杆菌(*Clostridium thermo cellum*)等直接发酵纤维素以产生酒精也是研究的一个方向, 本文仅对发酵运动单胞菌的酒精发酵进行介绍, 因为各国都公认, 目前它是可以和酒精酵母相匹敌, 甚至将来可能取而代之的唯一的细菌。

## 一、发酵运动单胞菌的发现

在生产甜的原汁苹果酒过程中, 经常会遇到苹果酒二次发酵, 结果产生大量气体, 酒变混, 甜味降低, 失去苹果酒原有的香味和口味, 最后酒又会变清, 但有大量的沉淀物产生。西方将这种现象称为“苹果酒病”。1911年Barker和Hillier从这种病酒中分离得到了一种运动性杆菌, 它的细胞为单个或成双, 大小为 $2 \times 1 \mu$ , 两端圆形, 兼性厌氧菌, 不产生孢子。在固体培养基上这种菌长得很慢, 菌落乳白色, 有粘性, 能旺盛地发酵葡萄糖或果糖, 并生成酒精和二氧化碳。不发酵蔗糖、麦芽糖和乳糖。这就是发酵运动单胞菌的首次发现。但是, 当时Barker等没有给这种菌以拉丁文命名。

1923—1924年Lindner在墨西哥从事龙舌兰汁的发酵研究, 发酵产品叫龙舌兰酒Pulque是一种含4—6%酒精的饮料, 引起这种发酵的微生物当时被命名为*Termobacterium mobile*, 后来定名为*Zymomonas mobilis*, 在此以后, 许多科学家分别从啤酒、棕榈酒、及发酵甘蔗汁中发现了发酵运动单胞菌, 到目前为止, 已知有*Z. Mobilis*和*Z. Pomaceae*等两个亚属和40多个菌株, 其中绝大多数是属于亚属*mobilis*。

## 二、发酵运动单胞菌的形态和生理特性

发酵运动单胞菌是革氏阴性菌，长 $2\sim 6\mu$ ，宽 $1\sim 1.5\mu$ ，单个或成双。比一般细菌( $0.5\sim 0.75\mu$ )宽。70%左右菌株不运动，30%左右是运动的。有1—4根鞭毛，45%的菌株鞭毛丛生。33%的细胞拉长呈丝状，长达 $28\mu$ 。不产孢子和荚膜。胞内不生成油脂和肝糖。在标准固体培养基上，深层菌落呈双凸镜状，卵形，奶油状，白色或乳白色，2天后直径达 $1\sim 2mm$ 。厌气，表面菌落扩展性，卵形或瘤形，直径达 $3\sim 4mm$ 。

*Z. mobilis* 生长需要葡萄糖或果糖，有些菌株可用蔗糖，在以下几种培养基中都能良好地生长：蛋白胨培养基 + 2% 葡萄糖；啤酒 + 2% 葡萄糖；棕榈汁等。在液体培养基中，67%的菌株生成紧密的沉淀，33%的菌株生成粘性颗粒状沉淀。

生长 pH 范围为 3.5—7.9，可见它比较耐酸，pH 范围比较广。在液体培养基中 pH 对生长的影响见表 1。

表 1 pH 对 *Z. mobilis* 生长的影响

培养液原始 pH	能生长菌株占全部菌株的 %	培养液原始 pH	能生长菌株占全部菌株的 %
3.05	0	5—7	100
3.50	43	7.5	87
3.70	71	8.0	0
3.85	90		

*Z. mobilis* 生长的最适温度为  $36^{\circ}\text{C}$ ，不同温度对生长的影响见表 2。

表 2 温度对 *Z. mobilis* 生长的影响

培养温度 $^{\circ}\text{C}$	能生长菌株占全部菌株的 %	培养温度 $^{\circ}\text{C}$	能生长菌株占全部菌株的 %
30	100	38	74
34	97	40	5
36	97		

死亡温度为  $60^{\circ}\text{C}$ 、5分钟，有的资料则说  $55^{\circ}\text{C}$ 、5分钟。

*Z. mobilis* 是从含 2—10% 酒精的不同饮料中分离得到的。在酒精浓度为 5.5% 时现有 40 多个菌株都能继续生长，在 7.7—10% 浓度的酒精中相应有 73—47% 的菌株还能生长。

*Z. mobilis* 在高浓度葡萄糖溶液中生长的情况是：在含 20% 葡萄糖的培养基中全部菌株在 34 小时以内开始生长；葡萄糖为 33% 时有 88% 的菌在 2—5 天后生长；糖浓度达 40% 时，有 54% 的菌株在 4—20 天生长。

葡萄糖和果糖的代谢因菌株的不同略有差异，40 个菌株每克分子葡萄糖产酒精的量为 1.5—1.9 克分子酒精。培养液的原始 pH 为 6.1，3 天， $30^{\circ}\text{C}$ ，培养后下降到 4.8—5.2。 $38^{\circ}\text{C}$  培养时，pH 下降情况更明显，有些菌株的 pH 下降到 4，对于 *Z. mobilis* ATCC 10980 来说，其代谢公式为：

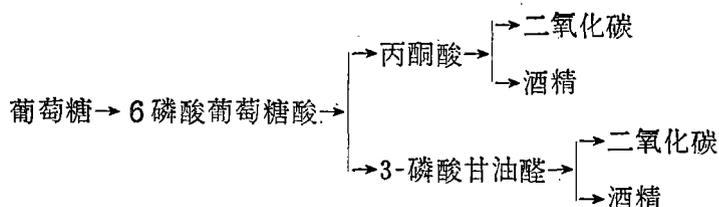


NCIB8938 的代谢公式为：

1 葡萄糖 → 1.93 酒精 + 1.8 二氧化碳 + 0.053 乳酸

大约有 98% 的葡萄糖转化成酒精和二氧化碳, 其余生成乳酸和乙醛等。

*Z. mobilis* 降解葡萄糖是按 Entner-Doudoroff 途径进行的, 这是迄今为止厌氧菌按 ED 途径代谢葡萄糖的唯一例子, ED 途径示意如下:



### 三、用发酵运动单胞菌进行酒精发酵的研究

从七十年代中期以来, 国际上对利用 *Z. mobilis* 开展酒精发酵开展了广泛的研究, 范围涉及下列几个方面:

#### 1. 菌种的选育和诱变

其目的是从现有的几十个菌株中选出最适合于酒精发酵的菌株, 并通过筛选或诱变获得具有絮凝等特殊性能的新菌株, 也有人认为在利用基因工程手段、培育新的优良酒精发酵菌株方面, 发酵运动单胞菌的条件优于酵母菌。

#### 2. 不同基质酒精发酵的研究

最早 *Z. mobilis* 的酒精发酵研究, 局限于以葡萄糖为基质、后来逐步扩大到以糖蜜为基质。最近的报道表明, 酒精发酵的基质已发展到纤维素酶水解液和淀粉, 这意味着朝实用化的发展。

3. 对发酵运动单胞菌酒精发酵的一些理论上的问题, 及它和酵母菌各自的酒精发酵特点进行了研究

为了有朝一日能在大规模酒精生产上应用发酵运动单胞菌, 人们对温度、酒精浓度、介质浓度、培养基组成份、生长因子对 *Z. mobilis* 的生长及酒精发酵的影响做了详细研究。例如法国 Jean-Pierre Belaich 研究了培养基成份对 *Z. mobilis* 生长和细胞产量的影响, 他发现, 如果培养基中不加酵母汁, 则一定要加泛酸盐, 后者是它的必需生长因子。同时, 在合成培养基(以氨基酸或氯化铵作为氮源)中加泛酸盐, *Z. mobilis* 的产量和生长速度只有全值(加酵母汁)培养基的一半, 证明这是一种能量非偶联的情况。通风会引起部分酒精变成醋酸, 但不能改变细胞的裂殖速度, 经过  $C^{14}$  葡萄糖同位素示踪测定, 发现在合成或丰富培养基中被代谢的葡萄糖有 2—3% 被细胞同化。另据报道 *Z. mobilis* 细胞中的碳有 52% 来自酵母汁或蛋白胨。

加拿大 Jared E. 等研究了在复合、半合成和限制三种培养基中 *Z. mobilis* 进行酒精发酵的动力学, 发现三者的动力学相似, 为简化培养基配方提供了依据。试验所用的限制培养基配方是: 每升中葡萄糖 100g, 聚丙烯乙二醇 2025 为 0.1ml,  $(NH_4)_2SO_4$  为 1.98g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  为 1.00g,  $KH_2PO_4$  为 3.48g, 生物素为 1mg, 微量元素液为 10ml, 柠檬酸为 0.21g, 冷酸钙为 1mg, 发酵结果见表 3。

表3 Z. mobilis 在不同培养基中的发酵动力学

培养基 \ 参数	$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$Y_{x/s}(g/g)$	$Q_p(g/g \cdot h)$	$Y_{p/s}(g/g)$	$V_p(g/l \cdot h)$
复合培养基	0.196	2.88	0.030	2.89	0.44	8.32
半合成丰富培养基	0.225	3.30	0.034	2.90	0.44	9.57
限定培养基	0.184	2.85	0.030	2.79	0.45	7.59

通过一系列的研究,人们公认利用 *Z. mobilis* 进行酒精发酵与酵母相比,具有以下一定的优点:

①糖的吸收速度要比酵母高 1—2 倍

②酒精得率比酵母高,每消耗 1 克分子葡萄糖可生成 1.9 克分子酒精

③连续发酵回用细胞时,酒精生产能力高达  $120g/l \cdot h$  而酵母最高为  $30-40g/l \cdot h$

④ *Zymomonas* 生长时完全不要氧气,酵母生长则要求有微量的溶解氧存在,因此在高细胞密度酒精发酵时,酵母要求通少量纯氧,而发酵运动单胞菌则不需要

⑤ *Zymomonas* 的正常发酵温度为  $36-37^{\circ}C$ ,比酵母高 6—7 度,有利于高温发酵的进行

⑥细菌比酵母容易进行遗传工程处理,以获得耐高温、耐酒精和能利用多种碳源的优良工程菌

#### 4. 不同发酵方法的研究

近几年来,各国科学家用各种不同的发酵方法进行 *Z. mobilis* 酒精发酵的研究,这些方法有:间歇法、连续发酵法、连续发酵结合细胞同用法、取得了发酵的各项重要参数值,对今后进行扩大试验具有重大意义,加拿大 Jared E. Fein 等将这些有关参数值归纳于表 4。

表4. 不同方法 *Z. mobilis* 酒精发酵动力学参数值比较表

发酵方法和利用	$D_{max}$ 时的动力学参数值						
	$S_R(g/l)$	$D(h^{-1})$	$X(g/l)$	$P(g/l)$	$V_p(g/l \cdot h)$	$V_{p/s}(g/g)$	$Q_p(g/g \cdot h)$
Zymomonas 菌株							
单细胞 CSTR 加细胞回用							
ATCC29191	100	3.41	63.73	44.34	151.19	0.46	2.37
ATCC10988	100	2.70	38.00	44.50	120.15	0.46	3.16
ZM <sub>4</sub>	120	3.30	50.00	60.00	198.00	0.50	3.96
真空发酵 ZM <sub>4</sub>	200	0.90	23.65	60.22* (112.9)	78.94	—	—
ZM481	180	0.97	33.00	88.00	85.00	0.49	2.58
凝聚酵母							
CSTRZM401	100	0.39	4.42	46.80	18.40	0.49	4.13
CSTR 加细胞回用 ZM401	100	0.92	13.65	47.87	43.61	0.50	2.79

续表 4

发酵方法和利用	$D_{max}$ 时的动力学参数值						
	$S_R$ (g/l)	$D$ (h <sup>-1</sup> )	$X$ (g/l)	$P$ (g/l)	$V_p$ (g/l·h)	$V_{p/s}$ (g/g)	$Q_p$ (g/g·h)
真空CSTR加回用 ZM401	150	0.73	11.33	37.10* (64.00)	46.4	—	—
半连续(分割法)ZM401	175	0.36	—	82.00	46.00	0.47	—
塔式发酵罐ATCC10988	105	2.10	40.00	47.50	99.75	0.49	2.37
固定细胞反应器							
角叉莱胶, ZM <sub>4</sub>	150	0.25	26.00	73.80	16.55	0.51	0.73
藻酸钙, ZM <sub>4</sub>	150	0.27	28.60	71.99	18.44	0.48	0.70
藻酸钙, ATCC10988	150	1.23	34.00	46.65	56.65	0.49	1.69

\*在括号外的数值表示发酵液中酒精的含量, 在括号中的是冷凝液中酒精的含量

#### 四、发酵运动单胞菌酒精发酵的最新研究

这里仅摘要介绍澳大利亚J.H.Lee 和西德 J.Kleim 1983年发表的两篇有代表性的文章。

##### 1. 用 *Zymomonas mobilis* 絮凝菌株进行淀粉的连续混合糖化酒精发酵

澳大利亚 J.H.Lee 发明了一种利用 *Zymomonas mobilis* 絮凝菌株进行液化淀粉连续混合糖化酒精发酵的新工艺, 为淀粉质原料进行细菌酒精发酵开辟了道路, 其研究内容摘要如下:

菌种: *Sacch. uvarum* ATCC 2660 和 *Zymomonas mobilis* ZM<sub>4</sub>。

原材料: 可溶性淀粉为 AR 级马铃薯淀粉。液化酶活力为 60KNU/g (1 个 KNU 等于在 pH 5.0、37°C 条件下, 每小时能水解 5.6 克淀粉的酶量)。葡萄糖淀粉酶的活力为 150AGU/ml (1AGU 等于在 pH 4.3、25°C 条件下每分钟裂解 1 μmol 麦芽糖的酶量)。空心纤维膜是 Amicon 公司产品, 型号是 DC10No172, 表面积为 0.93 米<sup>2</sup>, 正常截留分子量为 5000, 而葡萄糖淀粉酶的分子量为 1 × 10<sup>5</sup>。膜可重复使用。每次使用后用 1 N 的氢氧化钠和洗涤剂清洗, 再用蒸馏水漂洗几小时。第二次使用前再用 75% 的酒精消毒, 最后用无菌蒸馏水冲洗掉酒精。

##### 试验工艺流程

为了研究间歇发酵动力学, 一定量的淀粉加 2g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 并用自来水调成粉浆, 加到发酵罐内, 再加 0.1% (v/w) 的液化酶, 升温剂 70—75°C 糊化, 再加 0.1% (v/w) 液化酶在 95°C 下液化一小时后, 冷却到 35°C, 加入规定的葡萄糖淀粉酶和 10% 的细菌种子培养液, 进行混合糖化发酵。样品取出后加同样体积的 2N NaOH, 以中止糖化和发酵反应, 放在 0°C 保藏以供测定用。

进行连续混合糖化发酵时, 用两只发酵罐(工作容积 2 升), 一只罐用于液化, 另一只用于混合糖化发酵。淀粉浆在第一只罐中 95°C 进行液化, 液化液用泵打入第二只发酵罐(事先通过热交换器将液冷却 35°C)。进行混合糖化发酵。发酵液用泵送入空心纤维膜以回收细胞和酶, 后者回入发酵罐重复使用。本设备示意图见图 1。

结果

1) 葡萄糖淀粉酶添加量对糖化的影响 粉浆的淀粉浓度为136g/l,即150g总糖/l。糖化条件为35℃, pH=5.0。从图2可见,随着葡萄糖淀粉酶用量增加,糖化酶的起始速度增加,用量降低到0.2%(v/w)时糖化速度明显降低。用量为0.5%(v/w)25小时的DE值达96%。

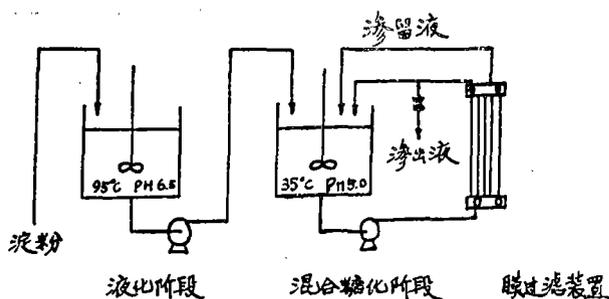
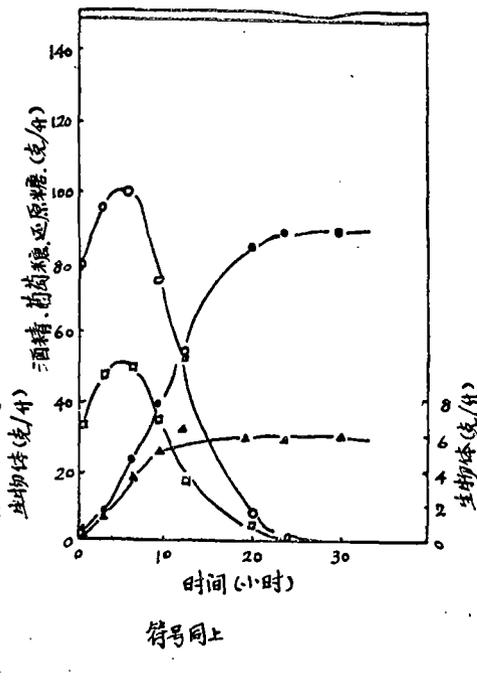
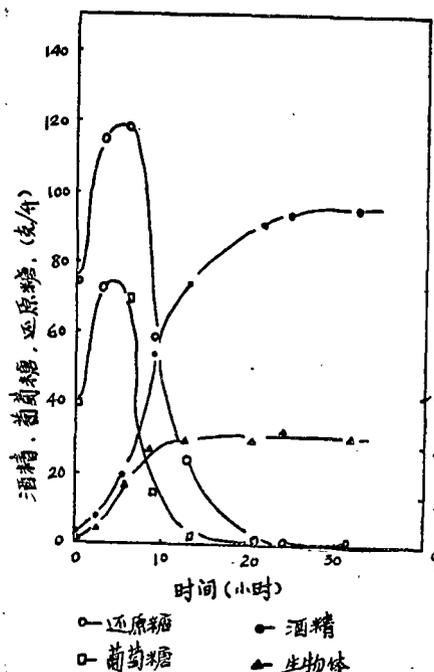
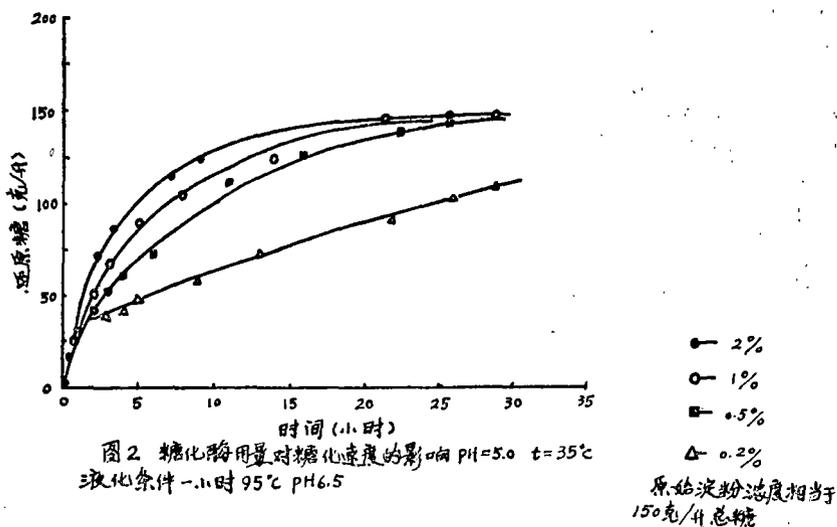


图1 淀粉混合糖化发酵实验装置

2) 间歇混合糖化发酵动力学

Z.mobilis的液化淀粉(200g总糖/l)间歇发酵动力学见图3。糖化剂用量为淀粉量的0.5%(v/w), pH=5.0, 温度为35℃。在开始的5小时内醪中的总还原糖和葡萄糖含量增加,以后则降低。发酵在25小时结束。最后的酒精浓



度为 95g/l。酒精产量为 0.47g/g 淀粉。图 4 为 Sacch.uvarum 的对照试验。发酵结果和 ZM<sub>4</sub> 相似，但 ZM<sub>4</sub> 酒精产率高。

不同糖化剂用量 (0.5%—0.2%) 对 ZM<sub>4</sub> 混合糖化发酵动力学影响的试验表明，当用量为 0.35% 时，酒精产生速度和 0.5% 时相同，一旦糖化酶用量降低到 0.2% 时，酒精产生速度就明显降低。如果糖化是在 60℃ 和 pH4.5 时进行，则只要用 0.15% (v/w) 糖化剂，20 小时内就可达到转化率 98%。

3) 连续混合糖化发酵试验 连续混合糖化发酵是和采用空心纤维膜装置回收糖化酶和菌体细胞结合在一起进行的(见图 1)。相当于 100g/l 总糖的淀粉加上前述无机盐制成粉浆，再加 0.2% (v/w) 液化酶，在第一罐中，95℃ 液化 2 小时，再用泵打入第二罐，速度为每小时一升。由于发酵罐的工作容量为 2 升，所以稀释比  $D = 0.5h^{-1}$ 。因为还有一部分渗留物(酶及细胞)要回入，所以实际的 D 值要更大一些。糖化酶用量为 5% (v/w)。如图 5 所示，酒精浓度达 48g/l，残糖为 1 g/l (是属于不能发酵的麦芽糖和异麦芽糖)。渗出液中无葡萄糖检出。同时发现，在连续发酵过程中葡萄糖淀粉酶的活性保持不变。这就说明，对于比较清洁的介质来说，35℃ 温度对于保持酶活力已经足够低了。

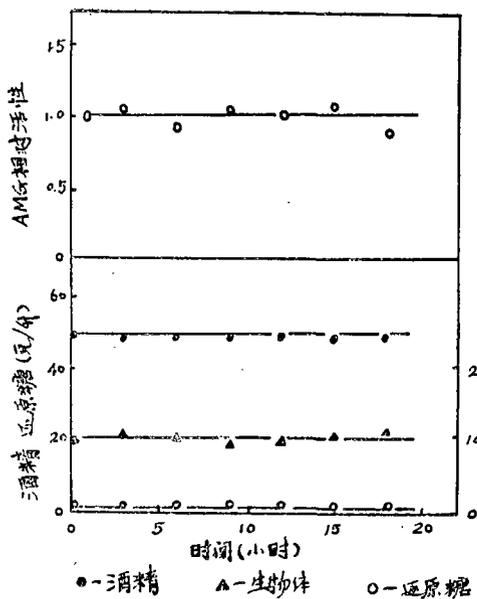


图 5 Z.mobilisZM<sub>4</sub> 液化淀粉连续混合糖化发试验总糖100g/l

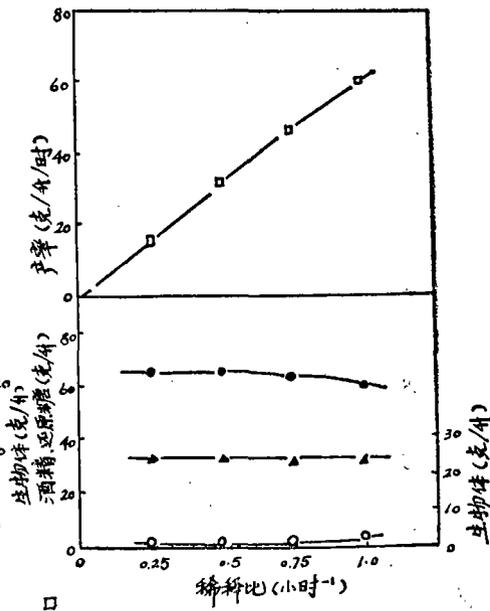


图 6 Z.mobilisZM<sub>4</sub> 液化淀粉连续混合糖化发酵试验 总糖130g/l

随后进行了增加醪液浓度和增加稀释比的试验。总糖含量增加到 130g/l，为了避免糖化剂用量成为限制性因素，将葡萄糖淀粉酶的用量提高到 7.5% (v/w)。

图 6 表明 D 增大的结果：在低 D 值时酒精度保持在 65g/l，当 D 值增大到 1.0 小时<sup>-1</sup> 时，酒精度下降到 60g/l。同时残还原糖增加。但进一步的检测表明，这种残还原糖不是葡萄糖。

连续混合糖化发酵过程采用了空心纤维膜装置以回收葡萄糖淀粉酶和细菌细胞。由于这一措施，试验中酶的真实用量按操作 50 小时计为  $7.5 \div 50 = 0.15\% (v/w)$ ，操作时间延长，

酶用量将进一步降低。

4) 结论 J. H. Lee 对淀粉的细菌发酵进行了探讨, 试验表明采用混合糖化发酵和回收酶及细胞的工艺是可行的, 为淀粉质原料细菌发酵提供了坚实的基础。J. H. Lee 目前在进行玉米, 木薯和小麦原料的细菌酒精发酵的研究。

## 2. 提高海藻酸钙固定化 *Z. mobilis* 酒精生产产率的研究

西德 J. Klein 等进行了提高固定化细菌酒精发酵生产产率的研究。由于采用了制备小直径颗粒的特殊技术和适合于酒精发酵动力学的反应器, 酒精产率达 56.5g/l, 酒精浓度为 74g/l, 系统连续运转达 65 天。

利用固定化酵母进行酒精生产的研究始于 1977 年, 由于固定化酵母具有酒精生产和耗糖速度快等优点, 得到了广泛的重视。近年来还研究了细菌细胞固定化技术, 固定细菌在高稀释比下连续发酵, 可提高细胞密度, 不发生洗出现象, 细胞的损失减少到最低程度。海藻酸钙是一种良好的包埋剂。为了进一步提高酒精生产效率, 必需解决制备具有足够机械强度的小直径颗粒技术。凝胶颗粒小, 介质传递的阻力也就小, 催化作用的效率就可以提高。J. Klein 等设计了一种专门的装置, 利用喷嘴和气流可制备直径为 0.5—3.0 毫米之间的颗粒(平均直径为 0.8 毫米)。

在海藻酸凝胶中, 开始细菌数并不多, 为了让细菌细胞生长, 将凝胶粒装入三罐发酵系统中, 连续高速流加完全培养基 ( $D = 4.0 \text{小时}^{-1}$ )。温度为 30℃, 经五天培养后, 培养液中的酒精浓度稳定。这说明, 凝胶粒中细菌细胞数已达平衡状态。

J. Klein 等进行的第二方面试验是设计一种新型固定化细胞连续发酵系统。目前最常用的固定化细胞反应器是固定床反应器。在这类反应器中, 由于大量气体的产生和上升, 会发生气体的通道问题, 并形成死角和减少固液接触的面积。为了解决这个问题, J. Klein 等设计了由三只罐组成的试验系统, 见图 7。

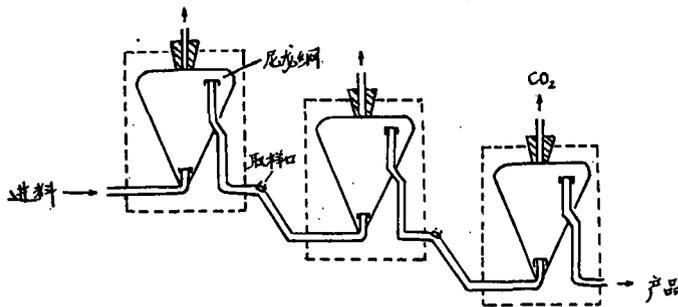


图 7 酒精发酵三罐系统

三只罐的总工作容积为 84 毫升(原文如此)每只罐的充满程度不一样, 第一只为 65%, 第二只 62%, 第三只 41%。由于第一、二只罐内产生大量气体引起的搅动, 罐内液体具有湍流的性质, 但和有搅拌器的发酵罐相比不存在剪切力。第三只罐产生气体量少, 具有层流性质, 为外锥形反应器保证了气体的畅顺排出。

流加 15% 葡萄糖的培养液, 当稀释比  $D$  发生改变时, 整个系统要 4—6 小时后才能再次出现稳定状态, 图 8 表示不同  $D$  时的发酵状态。

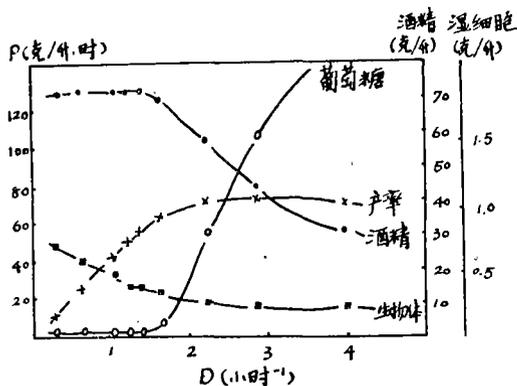


图8 稀释比对进程参数值的影响

○—葡萄糖； ×—产率  $P_g$ ；  
■—菌体； ●—酒精。

从上图可见,当 $D=1.37$ 小时<sup>-1</sup>时,糖消耗为98%,酒精产率以工作总容量计算达56.5;折算成液体总量达 $9.85\text{g}/\text{l}\cdot\text{h}$ 这是到目前为止细菌发酵最高的酒精产率。有些报道中提到产率达 $100\text{g}/\text{l}\cdot\text{h}$ 以上,但与此相应的糖的利用率仅达64—83%,整个系统经过65天的连续操作,小而且硬的凝胶颗粒并没有被内部产生的二氧化碳气体所破裂。气体能在颗粒之间顺利地移动。颗粒内的细菌会形成菌丝,但并不影响质的传递。这些情况表明J. Klein的试验达到了预定的目标。

### 结 束 语

目前,国际上对细菌酒精发酵的研究还是处在实验室研究阶段,但是由于研究的广泛和采用方法的先进,进展非常迅速。我国在这方面的研究如果不尽快开展,则势必落后。细菌发酵具有上述多种优点,仅拿耐高温这一点来说,就有很大的现实意义。我国有不少地区的酒厂或酒精厂严重缺水,特别在夏天,往往因冷却水不足,或水温过高而造成生产损失。采用细菌发酵。其正常发酵温度为 $36\text{—}37^\circ\text{C}$ ,应该可以解决或缓解这些工厂的缺水问题。

### 文内采用符号的意义

$D(\text{h}^{-1})$  稀释比

$x(\text{g}/\text{l})$  菌体密度

$Y_{x/s}(\text{g}/\text{g})$  菌体产率

$Q_p(\text{g}/\text{g}\cdot\text{h})$  单位菌体的酒精产率

$Y_{p/s}(\text{g}/\text{g})$  介质的转化率

$V_p(\text{g}/\text{l}\cdot\text{h})$  单位容积的酒精产率

CSTR 连续搅拌罐式反应器

$D_{max}$  最大稀释比

$S_R(\text{g}/\text{l})$  介质浓度

$P(\text{g}/\text{l})$  酒精浓度

$V_T(\text{g}/\text{l}\cdot\text{h})$  工作容积的酒精产率

### 参考文献

- [1] Biotechnology letters, 1981—1983
- [2] Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXV. 659—669((1983)
- [3] European J. Applied Microbiology and Biotechnology, (1982) 14, 69—73
- [4] Journal of Bacteriology, May 1965, p.1195—1200
- [5] Bacteriological Reviews, Mar. 1977 p. 1—46