

利用发酵法和酶法综合技术改进 玉米淀粉生产湿法浸泡工艺

赵寿经¹, 黄丽¹, 王辉², 钱延春¹, 徐立新¹

(1. 吉林大学 生物与农业工程学院, 长春 130022; 2. 长春大成实业集团有限公司, 长春 130118)

摘要:通过设计三水平三因素正交实验优化了嗜热乳酸菌发酵和菠萝蛋白酶酶法综合加工工艺, 获得玉米淀粉的浸泡工艺条件为: 浸泡水温度 50 ± 2 °C; 嗜热乳酸菌接种量 10%; 发酵浸泡玉米时间 12 h, 然后加入 0.2% 菠萝蛋白酶作用 4 h, 精磨后分离获得淀粉。改进后的工艺过程不添加 SO_2 , 浸泡时间从传统的 48 h 缩短至 16 h。

关键词:食品加工技术; 嗜热乳酸菌; 菠萝蛋白酶; 玉米淀粉湿法加工工艺

中图分类号: TS234 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-5497(2008)06-1489-06

Improvement on corn starch wet-steeping process by microbiology fermentation and enzyme

ZHAO Shou-jing¹, HUANG Li¹, WANG Hui², QIAN Yan-chun¹, XU Li-xin¹

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China; 2. Changchun Dacheng Industry Group Company Limited, Changchun 130118, China)

Abstract: An orthogonal experiment with three levels and three factors was carried out to optimize the corn starch production process using lactic acid bacteria and bromelin. The results suggest that the optimal conditions for this corn steeping processing are: steeping water temperature 50 ± 2 °C, inoculation of lactic acid bacteria 10%, steeping corn for 10 h, then adding 0.2% bromelin, grinding the corn for another 6 h. This technology can reduce the steeping time from 48 h (by traditional technology) to 18 h, and it also eliminates the use of SO_2 .

Key words: food processing technology; lactobacillus thermophilus; Bromelin; wet process of corn starch

目前,国内外玉米淀粉生产主要采用湿法加工工艺^[1]。该工艺中,玉米籽粒被制成淀粉之前,需要在 50 ± 2 °C 的含 0.2% SO_2 的水溶液中浸泡 48~72 h。目的是软化玉米胚乳并由 SO_2 溶于水产生的亚硫酸破坏包裹淀粉颗粒的蛋白质,同时在后续的碾磨中帮助淀粉和蛋白质的分离^[2-3]。尽管浸泡工艺具有淀粉回收率高、可获得多种副

产品的优点,但同时也存在着浸泡时间过长、成本高和能源消耗大等问题。特别是 SO_2 的使用,不仅会带来环境污染,而且在一定程度上造成设备腐蚀及产品中亚硫酸的残留^[4-5]。因此,利用生物技术手段探讨缩短浸泡时间和替代 SO_2 的新工艺是提升该传统产业的有益尝试。

作者从玉米淀粉生产厂的玉米浆中筛选出耐

收稿日期: 2007-08-06.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20050201).

作者简介: 赵寿经(1961-),男,教授,博士生导师. 研究方向: 生物工程. E-mail: swgc@jlu.edu.cn

50 °C 高温的嗜热乳酸菌,通过在玉米浸泡阶段加入发酵的嗜热乳酸菌,缩短玉米细胞破壁所需的有效乳酸浓度到达的时间。由于乳酸菌发酵有效地降低了浸泡水的 pH 值,所以在浸泡过程的第 1 阶段不加入 SO₂ 同样可以抑制其他微生物的生长。在玉米浸泡过程中,利用菠萝蛋白酶替代 SO₂,通过对菠萝蛋白酶在玉米浸泡工艺条件下(50±2 °C, pH=4)的酶促反应规律研究,合理的设计出替代 SO₂ 的酶法浸泡新工艺。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

玉米浆、玉米籽粒均为长春大成实业集团有限公司玉米淀粉生产车间提供。菠萝蛋白酶为台湾 Sigma 公司生产,活力为 3.2 U/mg,适宜为 pH 4.6,适宜温度为 25 °C。

1.2 试验设备

JJ-2 型组织粉碎器,低速落地离心机, HZQ-F 全温振荡培养摇床, GZX-9240 数显鼓风式干燥箱,日本岛津 SCL-10A 高效液相色谱仪,日本岛津 UV-2450 紫外分光光度计。

1.3 试验方法

1.3.1 嗜热乳酸菌株的初选及复选

取工业玉米浆 10 mL,分别稀释至 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 和 10⁷ 倍,然后分别取 1 mL 涂于溴甲酚紫-碳酸钙平板上,在 50±2 °C 培养 24~48 h。挑取有溶钙圈的单菌落,在平板上进行划线分离,反复纯化。分离出变色圈大的菌落接入斜面保藏^[6]。

复选:取菌株 MRS 液体培养基活化→10% 接种量接入种子培养基中发酵→测生长曲线、乳酸定量定性分析→检验遗传稳定性^[7]。

1.3.2 菌株生长曲线的绘制

将待测的菌株接种于 100 mL 的 MRS 液体培养基中,50±2 °C 培养 24 h,吸取 10 mL 培养液接种于 90 mL 的 MRS 液体培养基中,继续培养。每隔 2 h 取样测定 OD₆₀₀ 值。以培养时间为横坐标,OD₆₀₀ 值为纵坐标,绘制生长曲线。

1.3.3 高效液相色谱定性定量检测乳酸

色谱条件:日本岛津 SCL-10A 高效液相色谱,UP-C180DS 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm);柱温 25 °C;进样量为每次 5 μm。主要试验步骤为:取 100 mL 发酵后的玉米浸泡液,稀释离心,取上清液。用 0.22 μm 的微孔滤膜进行过

滤,经液相色谱检验与乳酸标准品作比较,进行定性定量分析。

1.3.4 产酸曲线的绘制

将菌株接种于斜面上培养 24~48 h 取出,挑取部分菌落到种子培养基中活化。活化培养 24 h 后,取 10 mL 菌液接种于 90 mL 发酵培养基中,继续培养。24 h 后,取 10 mL 菌液接种于 MRS 培养基中培养,每隔 2 h 取样,测定乳酸含量。以培养时间为横坐标,乳酸含量为纵坐标,绘制菌体的产酸曲线。

1.3.5 淀粉的制备及浸泡效果评价

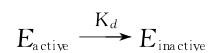
淀粉采用 Dowd^[8] 等报道的 100 g 玉米淀粉实验室生产方法。在此基础上改进用 63% 蔗糖溶液离心分离代替水槽分离。在玉米浸泡阶段设 0.2% 亚硫酸、10% 嗜热菌、0.2% 亚硫酸 + 10% 嗜热菌 3 个处理,观察籽粒达到饱和时各处理所需时间。

1.3.6 菠萝蛋白酶活力检测

菠萝蛋白酶在一定温度与 pH 值条件下,水解酪蛋白底物,然后加入三氯醋酸中止酶反应,并沉淀除去未水解的酪蛋白,滤液对紫外光有吸收,用紫外分光光度法测定,根据吸收度计算酶活力^[9]。

1.3.7 菠萝蛋白酶热失活动力学

根据对菠萝蛋白酶的热动力学研究,温度恒定时,菠萝蛋白酶的热失活遵循动力学一级反应规律^[10],即



则有
$$\frac{d[E]}{dt} = -K_d[E] \quad (1)$$

式中:[E]为活性酶浓度;K_d为热失活常数。

将公式(1)转化为积分形式

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -K_d t \quad (2)$$

式中:[E₀]为酶的初始浓度。

以 ln[E]/[E₀]对 t 作图得一过原点直线,斜率为 K_d,从公式(2)求得酶的热失活半寿期 t_{1/2} = ln2/K_d。

1.3.8 发酵法与酶法综合工艺的优化

采用正交试验设计^[11]。设玉米籽粒在含有 10% 嗜热乳酸菌的浸泡水中浸泡 8、10、12 h,加入菠萝蛋白酶 10、20、50 mg,加酶后反应时间为 2、4、6 h,因素水平表如表 1,正交表选用 L₉(3⁴),所有试验的浸泡温度均为 50±2 °C。

表 1 正交试验表

Table 1 Table of orthogonal experiment

水平	因 素		
	A:浸泡时间/h	B:添加酶量/mg	C:反应时间/h
1	8	10	2
2	10	20	4
3	12	50	6

2 结果与分析

2.1 嗜热乳酸菌的筛选

根据出发菌株分离步骤,在 MRS 平板培养基上进行菌种分离,初步分离出菌株 64 株,经过革兰氏染色镜检、接触酶反应和溴甲酚紫-碳酸钙平板试验,筛选出 18 株符合条件的菌株。对 18 株初筛的菌株进行高温发酵产酸比较,结果筛选出 4 株产酸性能和稳定性较好的菌株,分别为 C4、C6、E2 和 G7。其形态特征见表 2。

表 2 4 株高产乳酸菌菌落及菌体形态

Table 2 Shape of thalli 4 high yield lactobacillus thermophilus

编号	菌落形态(培养 60 h)	菌体形态
C4	乳褐色,板球状隆起,光滑圆整,直径 0.5~1.5 mm	G+,杆状,单个或成对
C6	乳褐色,油状,扁平,直径 0.75~2.5 mm	G+,短粗杆状,单个成堆
E2	乳白色,半球状隆起,光滑圆整,直径 0.5~1.5 mm	G+,细杆状,成链
G7	乳白色,油状,扁平,直径 0.75~2.5 mm	G+,杆状,单个或成对

2.2 嗜热乳酸菌的生长曲线

C4、C6、E2 和 G7 菌株的生长曲线如图 1 所示。从生长曲线可见,C4、C6 两种菌株的生长繁殖速度较快,在 10 h 左右达到稳定。且 C4 的生长最旺盛,繁殖周期短,表现优异。C4 菌株在接种 4 h 后生长速度明显加快,进入对数生长期;在 10 h 左右时生长基本达到稳定,OD 值上升开始缓慢,菌种发酵基本完毕。

2.3 C4 菌株乳酸含量检测及产酸曲线

根据标准样品色谱图获得乳酸标准曲线,分别检测 C4 菌株乳酸产量。计算发酵 4、10、16、24、32 h 的发酵液中乳酸含量,结果为分别含乳酸 0.12、15.18、16.90、18.65、18.72 g/L。产酸

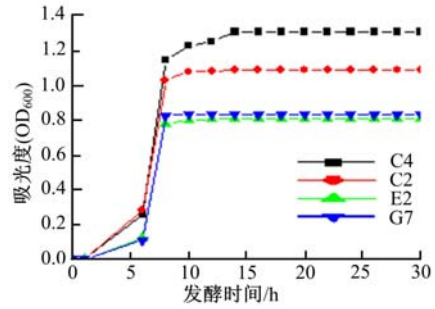


图 1 4 菌株生长曲线比较

Fig. 1 Growth curve of 4 lactobacillus thermophilus 曲线如图 2 所示。比较 C4 菌株产乳酸的变化趋势,乳酸含量在 18.70 g/L 附近开始稳定。从含葡萄糖 20 g/L 的 MRS 培养基出发,经发酵最终乳酸产量为 18.72 g/L,转化率为 93.6%。

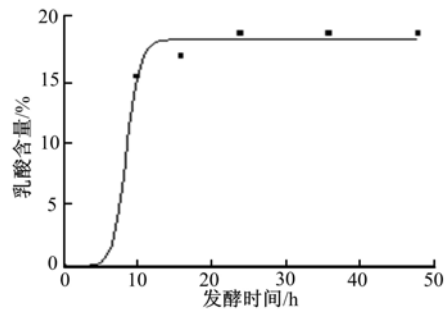


图 2 C4 菌株乳酸含量随时间变化曲线

Fig. 2 Lactic acid content curve of C4 lactobacillus

2.4 嗜热乳酸菌对玉米籽粒浸泡效果的影响

在含有 0.2% 亚硫酸的玉米浸泡水中加入 10% C4 菌株处理的浸泡效果优于其他处理。以 0.2% 亚硫酸、10% C4 菌株、10% C4 菌株 + 0.2% 亚硫酸 3 个处理的籽粒吸水率为纵坐标,浸泡时间为横坐标作图,可得图 3。图 3 表明,在

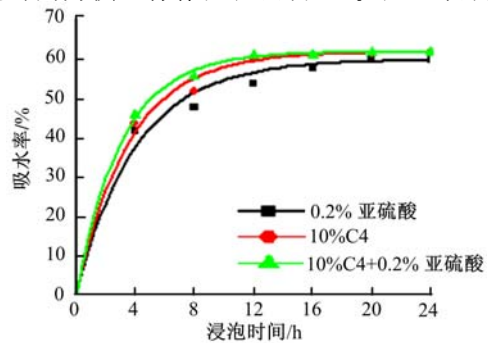


图 3 浸泡水中加入 0.2%亚硫酸、10%C4 和 10%C4 + 0.2%亚硫酸三个处理的浸泡效果

Fig. 3 Steeping effect of the three different manage of 0.2% H₂SO₃, 10%C4 and 10%C4 + 0.2% H₂SO₃ in steeping-water

50±2 °C 的浸泡温度下,传统工艺需要 20 h 达到饱和,而含有 10% C4 嗜热乳酸菌和 10% C4+0.2% 亚硫酸处理的浸泡液在 12 h 左右能使玉米籽粒达到饱和。说明嗜热乳酸菌能缩短玉米的浸泡时间,在此阶段人工加入嗜热乳酸菌可以替代 SO₂。乳酸在浸泡过程中虽不能直接作用于蛋白质网格使淀粉颗粒游离,但能在种皮细胞上形成有助于玉米籽粒内外物质交换的坑洞。

对比人工加入 10% C4 乳酸菌前后的玉米种皮,发现浸泡 12 h 后玉米种皮的纤维组织较浸泡前稀疏,并且在显微镜下能观察到局部出现的坑洞和缝隙(见图 4 及图 5)。说明浸泡 12 h 已达到乳酸破壁的效果。为下一阶段蛋白酶分子的进入以及物质交换提供了条件。

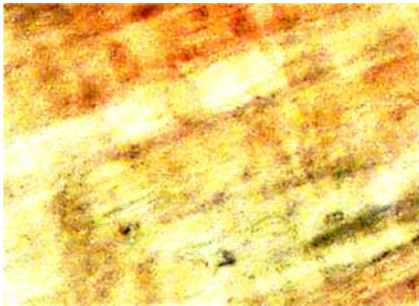


图 4 浸泡前玉米细胞表皮显微照片(50 倍)

Fig. 4 Micrograph of maize cell coat before steeping



图 5 浸泡后玉米细胞表皮显微照片(50 倍)

Fig. 5 Micrograph of maize cell coat after steeping

2.5 浸泡过程中乳酸含量与浸泡液 pH 的关系

通过定时测定加入嗜热乳酸菌后玉米浸泡过程中的乳酸含量和 pH 值的变化,发现随浸泡时间的增加,乳酸含量不断提高、pH 逐渐降低,并最终达到一个稳定值。结果见表 3。

表 3 表明,浸泡液中随着乳酸菌的不断繁殖,乳酸菌的数量较自然发酵的浸泡液中的数量明显增多,浸泡水的酸度也不断增加,在 pH 值为 4 时达到稳定。虽然后期乳酸含量还在不断增加,但 pH 值却不随之下降,可能原因是浸泡液中含有

大量的缓冲物质所致。

表 3 浸泡过程中乳酸含量和 pH 值随时间变化规律

Table 3 Lactic acid content and pH during steeping

浸泡时间/h	4	10	16	24	36	48
pH 值	6.5	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
乳酸含量/%	0.02	15.25	16.90	18.72	18.70	18.70

2.6 50±2 °C 下菠萝蛋白酶活力

用缓冲溶液将菠萝蛋白酶稀释至 1 mg/mL,在 50±2 °C 下反应 200 min,每 20 min 测定酶活力,观察 50±2 °C 下菠萝蛋白酶活力变化情况,绘制酶活力随时间变化曲线,如图 6 所示。

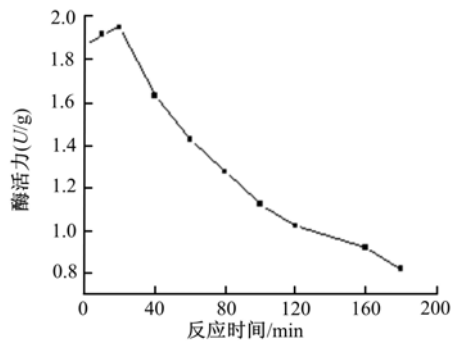


图 6 50±2 °C 下菠萝蛋白酶活力变化曲线

Fig. 6 The activity curve of Bromelin under 50±2 °C

图 6 表明,在 50±2 °C 的条件下,菠萝蛋白酶的酶初活力为 1.866 U/mg,30 min 左右后达到最大值 1.955 U/mg,然后随时间延长酶活力逐渐降低。

2.7 菠萝蛋白酶热失活动力学

观察菠萝蛋白酶在 50±2 °C 下酶活力与时间的关系,获得图 7 所示的酶热失活直线。由公式(1)、(2)计算得 $t_{1/2} = 150$ min。

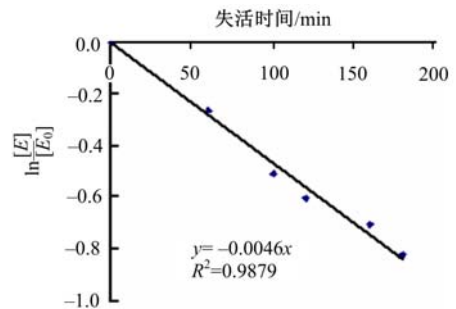


图 7 菠萝蛋白酶活力与时间关系

Fig. 7 The relation of Bromelain activity and time

2.8 有机羧酸盐对菠萝蛋白酶活力的影响

由于玉米浸泡液中含有大量的缓冲物质,乳酸菌发酵产生的乳酸以乳酸盐形式存在。乳酸盐

是一种有机羧酸盐类,与草酸钠、酒石酸钾钠等一样,对菠萝蛋白酶有一定的保护作用,使半寿期延长。

在 pH 为 4 的菠萝蛋白酶液中加入浓度为 0.025% 乳酸钠,以酶活力对时间作图,得图 8。根据图 8 计算酶的热失活半寿期 $t_{1/2}$ 为 346 min。说明在乳酸盐类存在的情况下,菠萝蛋白酶的半寿期得到了延长。

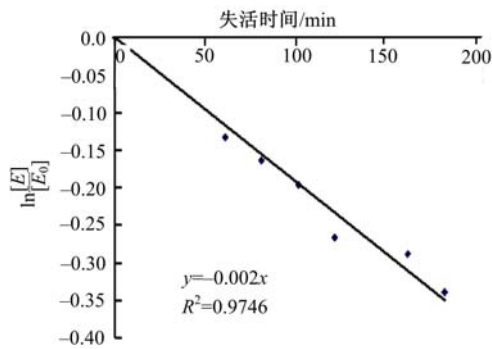


图 8 乳酸钠-菠萝蛋白酶与活力关系

Fig. 8 The relation of LA-Na Bromelin and activity

2.9 发酵法与酶法综合技术正交试验结果分析

根据上述嗜热乳酸菌发酵 8~10 h 后进入稳定期, pH 值在 12 h 左右达到最低值,而且用含 10% 嗜热乳酸菌的浸泡水浸泡玉米籽粒时,12 h 能达到饱和的试验结果,在综合技术正交试验中确定浸泡时间分别为 8、10 和 12 h。考虑到酶用量的多少决定着酶促反应达到平衡的时间长短。根据预试验和菠萝蛋白酶热失活动力学研究结果,确定加酶量分别为 10、20 和 50 mg,酶作用时间分别为 2、4 和 6 h 的正交试验。浸泡条件:水温 50 ± 2 °C,浸泡水含 10% 嗜热乳酸菌。结果见表 4。

表 4 发酵法和酶法综合技术工艺正交试验结果

Table 4 Orthogonal experiment results of the technology of fermentation and enzyme

编号	试验指标			
	浸泡时间 A	酶量 B	作用时间 C	淀粉得率
1	8	10	2	59.8
2	8	20	4	61.4
3	8	50	6	61.7
4	10	10	6	61.2
5	10	20	2	62.7
6	10	50	4	62.9
7	12	10	4	64.1
8	12	20	6	64.8
9	12	50	2	60.8

续表 4

编号	试验指标			
	浸泡时间 A	酶量 B	作用时间 C	淀粉得率
K1	182.9	185.1	185.2	
K2	186.8	188.9	188.4	
K3	189.7	185.4	187.7	
R	2.27	1.26	1.07	
优水平	A ₃	B ₂	C ₂	
最优组合	A ₃ B ₂ C ₂			

表 4 方差分析结果表明,加酶前的浸泡时间对淀粉得率的影响最大,这与玉米籽粒吸水程度有关。添加的酶量以 20 mg/10 g 为最优,即 0.2% 的加酶量。酶的作用时间以 4 h 比较适宜。由于乳酸菌发酵产生的乳酸盐类的累积,成为酶的稳定剂,延长了酶的寿命。

综合以上结果,新工艺的最佳条件为 50 ± 2 °C,浸泡水中加入嗜热乳酸菌发酵液浸泡 12 h,然后加菠萝蛋白酶 0.2%,作用 4 h。

2.10 新工艺与传统工艺的比较

以传统工艺(浸泡温度 50 ± 2 °C,乳酸 0.55%, 0.2% SO₂)为对照,比较新型工艺(浸泡温度 50 ± 2 °C,嗜热乳酸菌接种量 10%,发酵浸泡 12 h,然后加菠萝蛋白酶 0.2%,作用 4 h)的工艺效果,见图 9 和表 5。

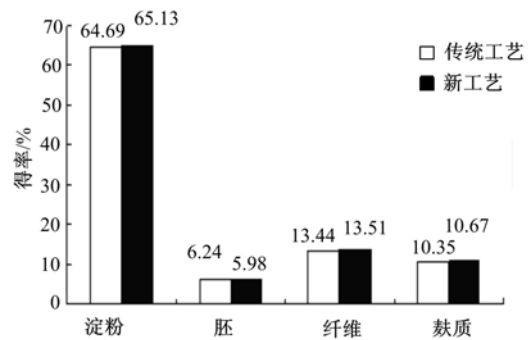


图 9 新工艺与传统工艺玉米各组分比较

Fig. 9 The cooperation of traditional and new methods in different groups of maize

图 9 和表 5 表明,改进后的新工艺浸泡周期缩短至 18 h 后,并不影响玉米淀粉、胚、纤维和麸质的得率。与传统工艺的得率比较,采用综合技术后淀粉得率为 $65.13 \pm 0.3\%$,且蛋白质含量平均降低了 0.04%。这与菠萝蛋白酶降解蛋白质的专一性和高效性有重要关系。试验证明改进后的玉米淀粉加工工艺,能取替 SO₂,从而使整个浸泡工艺不添加 SO₂ 也能达到传统工艺浸泡的最终效果,同时整个浸泡时间由 48 h 缩短为 16 h。

表5 新旧工艺玉米淀粉得率比较

Table 5 Compare of the yield of the corn starch in different technics

回收率/%	最小值	最大值	平均值	S ²	C _v	C _v
胚	5.81	6.14	5.98	0.12	2.0	2.1
纤维	13.35	13.85	13.51	0.16	1.2	1.3
淀粉	64.35	66.2	65.13	0.21	0.3	0.3
洗涤水中干物质	0.04	0.07	0.06	0.02	30.0	25.0
麸质	10.44	10.89	10.67	0.22	1.9	2.0
淀粉中含蛋白质	0.09	0.14	0.12	0.03	5.9	6.2
麸质中含蛋白质	60.01	64.4	61.2	0.43	1.0	0.7
纤维中淀粉含量	30.34	34.11	31.54	0.9	2.9	2.5
淀粉回收率	94.1	98.1	96.2	0.6	0.5	0.3
蛋白质回收率	58.46	62.34	61.27	0.8	1.7	1.3

3 讨论与结论

在传统的玉米浸泡工艺中,不充分的前浸泡和较低的 SO₂ 浓度会出现玉米淀粉得率不高和杂菌污染严重的情况^[12]。而直接加入菠萝蛋白酶,由于酶分子比较大,很难进入胚乳,也会导致酶尚未与胚乳相接触就被直接排除掉的可能。本工艺首先将玉米籽粒在含有嗜热乳酸菌的浸泡液(50±2 °C)中发酵浸泡 12 h,让玉米籽粒充分吸水至饱和,细胞壁受到乳酸的破坏。然后加入菠萝蛋白酶,继续浸泡作用 4 h,使菠萝蛋白酶通过乳酸菌在细胞壁上产生的坑洞进入玉米籽粒细胞,降解包裹淀粉颗粒的蛋白质二硫键,充分释放淀粉。

在传统浸泡中,主要是靠 SO₂ 抑制其他微生物的生长。本工艺中由于人为加入乳酸菌,使乳酸菌的含量大大提高,发酵所产生的乳酸不断累积,能较快速地降低浸泡液的 pH 值,同样能有效地抑制其他微生物的生长,起到了替代 SO₂ 的效果。

在嗜热乳酸菌发酵液中,乳酸菌产生的乳酸以乳酸盐的形势存在,使菠萝蛋白酶的半寿期延长至 346 min。提高菠萝蛋白酶的热稳定性,就能保证菠萝蛋白酶在水解过程中不致过早失活而不能发挥其作用。

利用正交试验获得优化的工艺参数为:50±2 °C下,嗜热乳酸菌接种量 10%发酵液浸泡玉米籽粒 12 h,然后添加 0.2%菠萝蛋白酶,酶解反应 4 h,经精磨分离淀粉。

参考文献:

[1] 王国扣. 我国淀粉生产现状及经济形势分析[J]. 淀

粉与淀粉糖,2002(4):33-35.

Wang Guo-kou. The analysis of starch-producing situation and economical outlook [J]. Starch and Starch Sugar,2002(4):33-35.

[2] Roushdi M, Ghali A H. Foemation of lactic acid during corn steeping[J]. Egypt J Food Sci,1991, 7(12): 17-25.

[3] Dailey O D. Effect of lactic acid on protein solubilization and starch yield in corn wet-mill steeping: A study of hybrid effect[J]. Cereal Chem, 2002, 79(2): 257-260.

[4] Roushdi M, Fahmy M M. Role of lactic acid in corn steeping and its relation with starch isolation[J]. K Ei-Sheikh Starch,1981,33: 426-428.

[5] 孙先明,孙锦秀,马君. 玉米深加工技术现状与对策[J]. 农机化研究,2005(01): 75-76.

Sun Xian-ming, Sun Jin-xiu, Ma Jun. The present status and countermeasures on maize deep processing technology in our country[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research,2005,(01): 75-76.

[6] 方祥,胡文峰,张辉华,等. 乳酸菌的分离、鉴定及其生长特性[J]. 中国微生物学杂志,2000,12(5):262-264.

Fang Xiang, Hu Wen-feng, Zhang Hui-hua, et al. Isolation, identification and characterization of Lactic Acid Bacteria[J]. Chinese Journal of Microecology,2000,12(5): 262-264.

[7] 王鑫,马桂荣,孔健,等. 几株乳酸菌的分离鉴定[J]. 生物技术,1994, 4(1): 37-39.

Wang Xin, Ma Gui-rong, Kong Jian, et al. Isolation and identification of several strains of lactic acid bacteria[J]. Biotechnology,1994, 4(1): 37-39.

[8] Dowd M K. Improvements to laboratory-scale maize wet-milling procedure [J]. Industrial Corps and Products,2003(18): 67-76.

[9] 陈素华,洪鹏志,章超桦,等. 菠萝天然酶活力测定方法[J]. 湛江海洋大学学报,2004, 24(4): 63-65.

Chen Su-hua, Hong Peng-zhi, Zhang Chao-hua, et al. Determination and inflection activity of the crude enzyme activity of pineapple[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University,2004, 24(4): 63-65.

[10] Joan F Back,David Oakenfull,Malcolm B Smith. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols[J]. Biochemistry, 1979, 18(23): 5191-5196.

[11] 任露泉. 试验优化技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006.

[12] 刘亚伟. 玉米淀粉生产及转化技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003: 33-34.