

野生山毛豆蛋白制备及体外消化模拟研究

于立梅, 于 新, 曾晓房, 杨凤卿

(仲恺农业工程学院轻工与食品学院, 广东 广州 510225)

摘 要: 通过碱提酸沉法制备野生山毛豆蛋白, 并模拟人体消化环境, 采用胃蛋白酶、胰蛋白酶两步消化法分析山毛豆蛋白的消化行为。结果表明: 山毛豆中蛋白质含量约为 $(47.12 \pm 0.35)\%$, 大豆中蛋白质含量约为 $(44.17 \pm 0.48)\%$, 山毛豆含有 18 种氨基酸, 其中包括人体必需的 8 种氨基酸, 从非必需氨基酸来看, 山毛豆蛋白与大豆蛋白有相似的氨基酸组分, 氨基酸平衡状况较好, 接近参考蛋白模式; 山毛豆的体外消化率为 $(84.86 \pm 0.75)\%$, 大豆的体外消化率为 $(91.71 \pm 0.88)\%$, 山毛豆酶解液中的总氨基酸含量比大豆的略低, 但山毛豆酶解液中甘氨酸和色氨酸含量比大豆酶解液高很多, 游离氨基酸(FAA)含量比大豆的略高。

关键词: 山毛豆; 蛋白质; 消化率

Preparation and *in vitro* Digestibility of *Tephrosia candida* Protein

YU Li-mei, YU Xin, ZENG Xiao-fang, YANG Feng-qing

(College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: *Tephrosia candida* protein (TCP) was obtained through alkaline extraction and acid precipitation. Its digestion behavior was explored through two-step digestion using pepsin and trypsin in mimic digestion environment. Results exhibited that the content of soybean protein was $(44.17 \pm 0.48)\%$, the content of TCP was $(47.12 \pm 0.35)\%$ and this protein was composed of 18 kinds of free amino acids including 8 kinds of essential acids. However, similar amino acid pattern between TCP and soybean protein was observed. The digestibility of TCP was $(84.86 \pm 0.75)\%$, while the digestibility of soybean protein was $(91.71 \pm 0.88)\%$. The content of total amino acids of TCP hydrolysates was lower than that of soybean hydrolysates, but the contents of some of the tested free amino acids were higher than those of their counterparts in TCP hydrolysates.

Key words: *Tephrosia candida*; protein; digestibility

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0060-05

非洲山毛豆(*Tephrosia vogelii* Hook f)和山毛豆(*Tephrosia candida*)均为豆科蝶形花亚科, 灰叶属多年生灌木, 原产非洲, 主要分布于北纬 15° 至南纬 20° 的广大地区。近 10 多年来, 我国广东、广西、海南、云南、福建等省区大量种植山毛豆^[1]。山毛豆种子是一种脂肪和蛋白含量双高的豆类。其所含的能量充沛, 100g 山毛豆种子最多可提供 1513.34kJ 的能量。其所含的营养丰富, 其中不饱和脂肪酸含量高, 人体必需脂肪酸亚油酸含量占总体脂肪酸含量的 52.0%, 占山毛豆种子质量的 6.76%, 其蛋白质含量高达 38.73%, 可作为廉价的食用或饲用蛋白质来源, 满足生活、生产的需要^[2]。

蛋白质对人体十分重要, 各种食品中蛋白质含量是否丰富固然重要, 但能否被人体利用或利用多少, 是决定其营养价值的一个先决条件。消化率是动物从食物

中所消化吸收的部分占总摄入量的百分比, 是评价食物营养价值的重要指标之一。测定食物消化率主要有体外法和体内法。体内法测定的消化率能够比较真实的反映动物对食物的消化情况。但体内法测定方法复杂、时间长、费用高, 而且对外界环境的要求较高, 季节、温度、光照等都会影响消化率测定值。体外消化法是利用精制的消化酶或研究对象的消化道酶提取液在试管内进行的消化实验, 其测定值可近似反映动物对食物的消化率^[3-5]。目前, 国外一些报道把豆类蛋白突出的降胆固醇效果归因于其难消化组分, 特别是那些疏水性高的组分。可见, 有必要了解豆类蛋白在消化道环境下的消化行为, 及一些因素对该蛋白消化过程的影响。本研究通过模拟人体胃部消化环境的消化模型, 分析野生山毛豆蛋白的消化情形, 探讨不同酶 / 底物比对山毛豆

收稿日期: 2009-12-03

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2008B030302001)

作者简介: 于立梅(1973—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: biyingwang2003@163.com

蛋白的消化过程的影响,测定山毛豆的蛋白质体外消化率、总氨基酸的含量和游离氨基酸(FAA)的释放量。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

野生山毛豆采于广东从化上坡;大豆 吉林粮油市场。

盐酸、三氯乙酸、氢氧化钠(AR级);胃蛋白酶(1:10000) Sigma公司;胰蛋白酶(1:250) Genview公司。

1.2 仪器与设备

CS101-1E 电热鼓风干燥箱 重庆四达实验仪器有限公司;Agilent 1100 液相色谱仪 美国安捷伦公司;中草药粉碎机 天津市泰斯特有限公司;DHS-3C 型精密 pH 计、KDN-08C 凯氏定氮装置 上海雷磁仪器厂;SHZ-82 水浴恒温振荡器 金坛市恒丰仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 山毛豆蛋白(SPI)的制备

脱脂山毛豆粉用蒸馏水(1:10, m/V)分散(搅拌)完全,之后用 2mol/L NaOH 溶液调节至 pH10 以上,室温下搅拌 2h 后离心($9000 \times g$, 20~30min)。离心所得的上清液经 2mol/L HCl 溶液调节至 pH4.6,于 4℃放置 2h,之后离心。所得沉淀用蒸馏水洗 3 次,重新分散于蒸馏水,并调节至中性。该分散液经透析后冷冻干燥,即得山毛豆的分离蛋白^[6-7]。

1.3.2 样品中蛋白质含量的测定

采用微量凯氏定氮法^[8-10]。

1.3.3 山毛豆蛋白质的模拟体外消化

1.3.3.1 胃蛋白酶最适量的选择

分别称取 0.5g 山毛豆分离蛋白于 3 个消化管中,各加入不同量胃蛋白酶(酶与底物质量比分别为 1:50、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450)的 pH1.5 的 0.05mol/L HCl 溶液 30mL,在 37℃台式恒温摇床上保温 3h 后过滤,多次冲洗残留物,用凯氏定氮法测定残留物的蛋白质含量。通过计算样品蛋白质消化率,确定出胃蛋白酶的最适用量。

1.3.3.2 胰蛋白酶最适用量的选择

分别称取 0.5g 山毛豆分离蛋白于 3 个消化管中,用含有 1:350(酶与底物质量比)胃蛋白酶活性单位的浓度为 0.05mol/L 的 HCl 溶液做前处理,之后加 0.2mol/L 的 NaOH 溶液处理消化液使之 pH 值等于 6.8。再分别加入含不同胰蛋白酶(酶与底物质量比分别为 1:150、1:250、1:350、1:450)的 0.05mol/L 的 KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液。继续培养 3h,测定样品的蛋白质消化率,确定出胰蛋白酶的最适用量。

1.3.3.3 胃蛋白酶-胰蛋白酶复合处理法的消化程序参照参考文献[11-13]进行。

1.3.3.4 体外消化率的计算

$$\text{蛋白消化率} / \% = \frac{m_1 - m_0}{m_1} \times 100$$

式中: m_1 为样品蛋白质量/g; m_0 为消化后滤渣蛋白质量/g。

1.3.4 氨基酸组分分析的测定(包括总氨基酸和游离氨基酸)

氨基酸组分分析:精确称取一定量样品于特制水解管底部,加 6mol/L 盐酸,真空封管后于 $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水解 24h(色氨酸的水解条件为 4mol/L 氢氧化钠溶液, $(110 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水解 20h),冷却后定容、过滤和蒸干,再加入 0.02mol/L 的盐酸在空气中放置 30min,上安捷伦液相色谱仪测定 18 种氨基酸。游离氨基酸测定不用水解,酶解样品直接上安捷伦液相色谱仪测定。采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生反应。柱色谱条件: C_{18} 柱(4.0mm \times 125mm),柱温为 40℃,流速为 1.0mL/min,检测波长为 338nm 和 262nm(脯氨酸),流动相: A: 20mmol/L 乙酸钠溶液; B: 20mmol/L 乙酸钠溶液-甲醇-乙腈(1:2:2, V/V)。

2 结果与分析

2.1 山毛豆和大豆中蛋白质含量的测定

表 1 山毛豆与大豆蛋白质含量的对比
Table 1 Protein contents of *Tephrosia candida* and soybean

豆种类(0.5g)	蛋白质质量/g	质量分数/%
山毛豆	0.2356	47.12 ± 0.35
大豆	0.2209	44.17 ± 0.48

从表 1 可见,山毛豆中蛋白质含量约为 $(47.12 \pm 0.35)\%$,大豆中蛋白质含量约为 $(44.17 \pm 0.48)\%$,山毛豆所含的蛋白质要比大豆的多。

2.2 山毛豆和大豆氨基酸成分及含量分析

理想的运动蛋白应满足必需氨基酸(EAA)和非必需氨基酸(NEAA)之间平衡良好和支链氨基酸含量丰富的要求。因此,食物蛋白质营养价值的高低不仅体现在必需氨基酸的种类是否齐全,而且体现在必需氨基酸之间的比例及必需氨基酸与总氨基酸(TAA)的比例是否适宜^[14]。FAO/WHO 推荐理想蛋白质模式为氨基酸组成 EAA/TAA 在 40% 左右, EAA/NEAA 在 0.60 以上。山毛豆和大豆中必需氨基酸与非必需氨基酸含量见表 2。

从表 2 可看出,山毛豆和大豆中都含有 18 种氨基酸,其中包括人体必需的 8 种氨基酸,山毛豆蛋白样品

的蛋白质 18 种氨基酸总量为 38.08%，其中，必需氨基酸含量为 13.47%，非必需氨基酸含量为 24.61%。山毛豆的 $EAA/(EAA+NEAA)=35.37\%$ ， $EAA/NEAA=54.73\%$ ，大豆的 $EAA/(EAA+NEAA)=42.85\%$ ， $EAA/NEAA=74.98\%$ ，与 WHO/FAO 提出的 $EAA/(EAA+NEAA)$ 比值和 $EAA/NEAA$ 比值分别为 40% 左右和 60% 左右的参考蛋白模式相对相近，因此属于优质蛋白。支链氨基酸(BCAA)包括：*L*-亮氨酸、*L*-异亮氨酸和 *L*-缬氨酸都属于必需氨基酸，主要在骨骼肌中进行代谢，同骨骼肌的合成有着密切的关系。在运动中，支链氨基酸可以促进运动后恢复期蛋白质的合成代谢，加速肌肉合成，减少肌肉组织的分解，有助于肌肉块的增大^[15-16]。山毛豆中所含的支链氨基酸占到总氨基酸量的 15%，大豆所含的支链氨基酸占总氨基酸量的 13%。

表 2 山毛豆和大豆中必需氨基酸与非必需氨基酸含量
Table 2 Contents of EAA and NEAA in *Tephrosia candida* and soybean

必需氨基酸(EAA)	含量/%		非必需氨基酸(NEAA)	含量/%	
	山毛豆	大豆		山毛豆	大豆
异亮氨酸(Ile)	1.46	1.62	天冬氨酸(Asp)	4.06	4.51
亮氨酸(Leu)	2.74	2.74	丝氨酸(Thr)	2.10	2.23
赖氨酸(Lys)	1.88	1.88	谷氨酸(Glu)	7.40	8.69
蛋氨酸(Met)	0.50	6.78	甘氨酸(Gly)	2.27	1.79
苯丙氨酸(Phe)	2.88	3.02	丙氨酸(Ala)	1.44	1.50
苏氨酸(Thr)	1.64	1.75	胱氨酸(Cys- Cys)	0.11	0.14
色氨酸(Trp)	0.86	0.85	酪氨酸(Tyr)	1.43	1.55
缬氨酸(Val)	1.51	1.65	组氨酸(His)	1.07	1.39
			精氨酸(Arg)	2.87	3.01
			脯氨酸(Pro)	1.86	2.25
总量	13.47	20.29	总量	24.61	27.06

2.3 山毛豆体外消化率分析

2.3.1 酶与底物比(E/S)对山毛豆蛋白体外消化过程的影响

任何一种酶反应的反应速率都受酶本身浓度及底物浓度的影响，酶浓度(或酶活力)越高，酶反应则越快，即达到催化终点也越快。如果底物浓度较高，则酶反应保持较高反应速率的时间也较长。本实验通过分别测量胃蛋白酶和胰蛋白酶降解山毛豆蛋白底物所释放出的氮含量，讨论在一定山毛豆浓度下，不同酶与底物之比对山毛豆的体外胃蛋白酶消化过程的影响，从而选出胃蛋白酶和胰蛋白酶的最适用量。

2.3.1.1 胃蛋白酶最适用量的选择

通过测量胃蛋白酶降解山毛豆底物所释放出的氮含量，讨论山毛豆质量一定(0.5g)，不同酶与底物质量之比(1:50、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:350、1:400、1:450)对山毛豆蛋白的体外胃蛋白酶消化过程的影响，结果如图 1 所示，从而选出胃蛋白酶的最适用量。

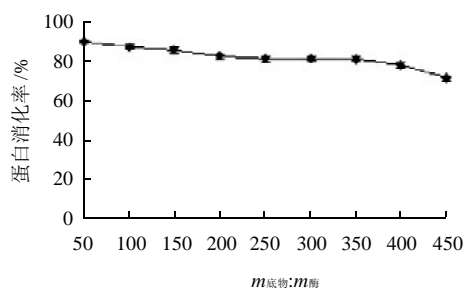


图 1 不同底物胃蛋白酶质量比条件下的山毛豆蛋白质体外消化率
Fig.1 Digestibility of *Tephrosia candida* protein digested by pepsin at varying dosages

由图 1 可见，随着底物与胃蛋白酶的比例不断增加，山毛豆的体外消化率不断减小，其减小的趋势与酶用量紧密相关。在较低的 E/S 比值下(如 1:450)，山毛豆蛋白的体外消化率仅为 75.24%。然而，随着 E/S 比的增大，氮的释放量不断增加，山毛豆蛋白的体外消化率也增大，E/S 比值为 1:350 时，山毛豆蛋白的体外消化率为 80.67%，之后趋于平缓。因此胃蛋白酶的用量应采用 1:350。图 1 也显示，对于任何一种蛋白，其蛋白的体外胃蛋白酶消化率取决于所采用的胃蛋白酶酶量。当加酶量达到一定程度后，酶与底物的作用达到饱和，加大酶的用量所产生的作用较小。

2.3.1.2 胰蛋白酶最适用量的选择

通过测定胰蛋白酶降解山毛豆底物所释放出的氮含量，讨论山毛豆质量(0.5g)，不同酶与底物质量比(1:150、1:250、1:350、1:450)对山毛豆蛋白的体外胃蛋白酶消化过程的影响，结果见图 2，从而选出胰蛋白酶的最适用量。

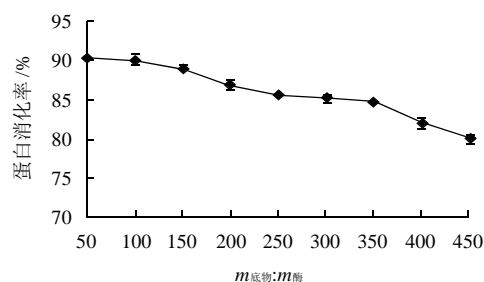


图 2 不同底物与胰蛋白酶质量比条件下山毛豆蛋白质体外消化率
Fig.2 Digestibility of *Tephrosia candida* protein digested by trypsin at varying dosages

由图 2 可见，随着底物与胰蛋白酶的比例不断增加，山毛豆蛋白的体外消化率也不断减小，其减小的趋势与酶用量紧密相关。随着 E/S 比值的增加，氮的释放量不断增大，山毛豆蛋白的体外消化率也增加，E/S 比值为 1:350 时，山毛豆蛋白的体外消化率为 84.53%，之后增加趋势缓慢。因此选胰蛋白酶的用量 E/S 应采用 1:350。

2.3.1.3 胃蛋白酶-胰蛋白酶复合处理法的消化分析

消化率是动物从食物中所消化吸收的部分占总摄入量的百分比,是评价食物营养价值的重要指标之一。本实验采用胃蛋白酶、胰蛋白酶两步体外消化法,首先用胃蛋白酶在酸性条件下完成食物在胃内的消化过程,再用胰蛋白酶在中性条件下继续消化,完成营养成分在小肠的消化过程,最后将已消化营养成分与未消化营养成分分开,结果见表3。

表3 山毛豆与大豆蛋白体外消化率

Table 3 *in vitro* digestibility of *Tephrosia candida* protein and soybean protein

豆种类(0.5g)	残渣蛋白质质量/g	体外消化率/%
山毛豆	0.03568	84.86 ± 0.75
大豆	0.01830	91.71 ± 0.88

表3显示,在同等条件下进行水解,山毛豆蛋白的体外消化率84.86%,大豆蛋白的体外消化率为91.71%。山毛豆作为野生资源,来源广泛,市场价格低于大豆很多,消化率稍低于大豆,可以作为大豆的替代品,所以在食品和动物饲料中具有潜在应用价值。

2.3.2 山毛豆和大豆蛋白酶解液中的总氨基酸和游离氨基酸含量的测定

表4 山毛豆和大豆蛋白酶解液中的总氨基酸含量

Table 4 Total amino acid contents in the separate hydrolysates of *Tephrosia candida* and soybean

检测项目	酶解液总氨基酸含量/(mg/100mL)	
	大豆蛋白	山毛豆蛋白
天冬氨酸	27.05	23.03
酪氨酸	7.23	6.74
谷氨酸	57.44	42.91
缬氨酸	8.69	6.27
丝氨酸	11.67	11.29
蛋氨酸	0.54	0.15
甘氨酸	8.91	14.06
胱氨酸	0.59	0.13
组氨酸	8.14	7.38
异亮氨酸	8.32	4.83
精氨酸	22.61	17.67
亮氨酸	14.36	1.33
苏氨酸	10.75	8.21
苯丙氨酸	15.80	12.95
丙氨酸	9.44	7.56
赖氨酸	14.98	13.73
脯氨酸	11.91	9.15
色氨酸	0.42	1.45
总量	238.85	188.84

蛋白质是构成人体细胞的主要成分,食物中的蛋白

质进入人体后经过消化先分解成氨基酸,氨基酸是构建生物机体的众多生物活性大分子之一,是构建细胞、修复组织的基础材料。氨基酸能够为机体和大脑活动提供能源,氨基酸是一切生命之源。山毛豆和大豆酶解液中的总氨基酸和游离氨基酸(FAA)含量的分析结果见表4、5。

表5 山毛豆和大豆蛋白酶解液中的游离氨基酸(FAA)含量

Table 5 Free amino acid contents in the separate hydrolysates of *Tephrosia candida* and soybean

检测项目	酶解液总氨基酸含量/(mg/100mL)	
	大豆蛋白	山毛豆蛋白
天冬氨酸	0.18	0.39
酪氨酸	1.45	0.58
谷氨酸	0.43	0.50
缬氨酸	0.10	0.27
丝氨酸	0.25	0.28
蛋氨酸	0.12	0.07
甘氨酸	0.22	6.56
胱氨酸	0.06	0.02
组氨酸	0.69	1.55
异亮氨酸	0.12	0.2
精氨酸	3.83	2.04
亮氨酸	0.29	0.57
苏氨酸	0.01	0.74
苯丙氨酸	0.80	1.38
丙氨酸	0.60	0.72
赖氨酸	1.56	2.19
脯氨酸	0.35	0.25
色氨酸	0.03	0.39
总量	11.09	18.7

由表4、5可知,山毛豆蛋白酶解液中的总氨基酸含量比大豆的略低,但山毛豆蛋白酶解液总氨基酸中的甘氨酸和色氨酸含量比大豆酶解液高很多,近来的研究表明,甘氨酸可通过作用于细胞膜上的甘氨酸受体(GlyR)防止枯否细胞过度激活,从而对多种原因引起的肝损害起明显的保护作用。色氨酸是一种必需氨基酸,可以防止烟酸缺乏症和增加血清素水平。在所有氨基酸中,色氨酸被认为是特定食品中含量最少的。虽然稀少,色氨酸是非常必要的,因为它会由肝脏转换成VB₃(烟酸和烟酰胺),这有助于防止烟酸缺乏症^[17]。山毛豆蛋白酶解液游离氨基酸(FAA)含量比大豆的略高,由此也证明了山毛豆蛋白的体外消化率比大豆略低。因此山毛豆蛋白具有较大的潜在应用营养价值。

3 结 论

本研究通过模拟人体胃部消化环境的消化模型,分析了山毛豆蛋白的消化情形,对比了山毛豆和大豆蛋白质的体外消化率,测定了总氨基酸的含量和游离氨基酸(FAA)的释放量。结论如下:山毛豆中蛋白质含量约为

(47.12 ± 0.35)%, 大豆中蛋白质含量约为(44.17 ± 0.48)%, 山毛豆所含的蛋白质要比大豆的多。山毛豆蛋白质模拟体外消化分析: 在一定蛋白浓度下, 随 E/S 之比的增加, 氮的释放量不断增加, 山毛豆蛋白的体外消化率也增加。胃蛋白酶最适量的选择为 1:350, 胰蛋白酶最适用量的选择为 1:350。山毛豆蛋白质体外消化率(84.86 ± 0.75)%, 大豆蛋白质体外消化率为(91.71 ± 0.88)%, 大豆蛋白的体外消化率比山毛豆高。山毛豆蛋白酶解液中的总氨基酸含量比大豆的略低, 游离氨基酸(FAA)含量比大豆的略高。综上所述, 山毛豆的蛋白质含量较高, 但体外消化率不如大豆, 但从成本来说, 山毛豆价格远远低于大豆, 所以山毛豆蛋白在食品和动物饲料中具有潜在应用价值。

参考文献:

- [1] 李小华, 李永胜, 曾晓房, 等. 非洲山毛豆和山毛豆资源的研究与利用[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2006, 21(4): 71-75.
- [2] 于新, 严卓勤, 李小华, 等. 非洲山毛豆种子物理特征与常量化学成分分析[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2008, 20(3): 16-18.
- [3] 颜品勋. 单一胃蛋白酶法评定青粗饲料蛋白质降解率的研究[J]. 饲料研究, 1995(11): 89-92.
- [4] 王卫国, 卢萍, 付旺宁. 七种饲料原料粉碎粒度与蛋白质体外消化率及能耗的研究[C]//中国粮油学会第二届学术年会论文选集(综合卷). 成都: 中国粮油学会储藏专业分会, 2002.
- [5] RAGAB D D M, BABIKER E E, ELTINAY A H, et al. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 207-212.
- [6] 刘永青, 吴丽生. 饲料中胃蛋白酶体外消化率的测定与探讨[J]. 太原科技, 1996(3): 19-22.
- [7] 王金梅, 张占琴, 王学军, 等. 菜籽蛋白的制备及其体外模拟消化[J]. 中国油脂, 2008(9): 10-15.
- [8] 姜绍通, 蒋连平. 菜籽饼粕中分离蛋白的制备[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 43-45.
- [9] 李智春, 王潍波, 赵国琦, 等. 葡萄糖处理豆粕对蛋白质保护效果的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2009(7): 22-25.
- [10] 苏军, 汪莉, 苏宁. 蛋白质测定中消化液澄清后适宜消化时间的探讨[J]. 中国饲料, 1996(11): 33-34.
- [11] 马丽娟, 金顺丹. 酶水解法评定鹿饲料蛋白质、有机物降解率的研究[J]. 动物营养学报, 1996, 8(2): 48-55.
- [12] CONE J W. Production of apparent ideal protein digestibility in pigs with a two-step *in vitro* method[J]. Sci Food Agric, 1993, 62: 393-400.
- [13] SAVOIE L, CHARBONNEAU R, PARENT G. *In vitro* amino acid digestibility of food protein as measured by the digestion cell technique [J]. Plant Food Human Nutr, 1989, 39(1): 93-107.
- [14] BUCHMANN N B. *In vitro* digestibility of protein from barley and other cereals[J]. Sci Food Agric, 1979, 30(6): 583-589.
- [15] BOISEN S, EGGUM B O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimation digestibility in pig feeds[J]. J Sci Food Agric, 1991, 50: 173-178.
- [16] 杜红延, 季勤. 大豆蛋白在食品工业中的应用[J]. 食品工业科技, 1987 (4): 56-59.
- [17] 孙远明, 余群力. 食品营养学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 52-61.