

专题介绍 Special Topics

植物 β -淀粉酶

齐继艳, 陈舟舟, 卢晗, 张亮, 沈文彪*

南京农业大学生命科学学院, 生命科学实验中心, 南京 210095

 β -Amylase in Plants

QI Ji-Yan, CHEN Zhou-Zhou, LU Han, ZHANG Liang, SHEN Wen-Biao*

College of Life Sciences, Laboratory Center of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘要: 介绍了植物 β -淀粉酶的蛋白质结构、热稳定性、突变体和遗传规律、生理功能、基因表达和调控的研究新进展, 并对今后此领域的研究作了展望。

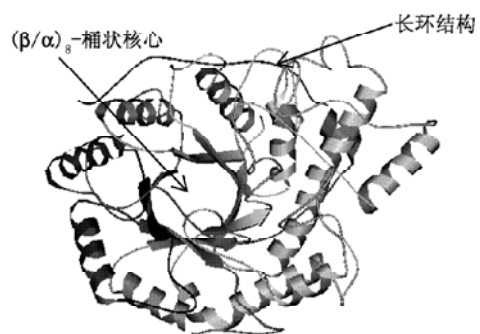
关键词: β -淀粉酶; 热稳定性; 遗传突变体; 生理功能; 基因表达

β -淀粉酶(β -amylase, EC 3.2.1.2, α -1,4-D-glucan maltohydrolase)广泛存在于植物和微生物中, 通过外切淀粉或寡葡聚糖等相关化合物中的 α -1,4-葡聚糖的非还原性末端, 直到第一个 α -1,6分枝点, 从而释放麦芽糖和 β -极限糊精(Sopanen 和 Laurière 1989)。早期研究认为谷物籽粒中的 β -淀粉酶可以通过参与淀粉的降解和转运为萌发提供能量, 例如水稻(*Oryza sativa*)种子萌发过程中的 β -淀粉酶活性是种子发芽势和活力的可靠指标。此外, 大麦(*Hordeum vulgare*) β -淀粉酶与麦芽糖化力密切相关, 因此也是衡量麦芽糖化力大小的主要育种指标。近年来, 有关植物 β -淀粉酶的研究引起了植物学界的广泛关注。本文对植物 β -淀粉酶的蛋白质结构、热稳定性、突变体和遗传规律、生理功能、基因表达的器官和发育特异性以及调控等研究领域的相关结果进行了初步概述, 最后讨论了该研究领域存在的若干问题。

1 蛋白质结构

绝大多数禾本科作物种子的 β -淀粉酶属于单体蛋白, 分子量范围为 53~64 kDa。大麦、黑麦(*Secale cereale*)和水稻胚乳专一型 β -淀粉酶的氨基酸序列中有一定相似性, 例如氨基酸序列中都含有高度保守的谷氨酸(Glu)残基。研究大麦 β -淀粉酶氨基酸全序列(Kreis 等 1987; Yoshigi 等 1994)发现其羧基末端有 4 个富含甘氨酸的重复区段, 而黑麦是 3 个重复区段(Rorat 等 1991)。另外, 麦芽糖和 α/β 环糊精(cyclodextrin, CD)分别是 β -淀粉酶的非竞争性和竞争性抑制剂。

β -淀粉酶的蛋白质结构包括一个典型的 $(\beta/\alpha)_8$ -桶状核心和一个羧基末端的长环结构(图 1)。活性中心的 Glu186 和 Glu380 位于 $(\beta/\alpha)_8$ -桶状核心的深部, 此结构被认为是切割多聚糖非还原性末端的最佳结构(Mikami 等 1993)。Glu186 和 Glu380 分别承担酸和碱性催化作用, 其中 Glu186 充当酸碱催化反应中的质子供体, Glu380 则在活化水分子中起着重要作用(Kang 等 2004)。Mikami 等(1994)研究还发现 Glu186 和 Glu380 对从淀粉中释放 β -麦芽糖起着关键的催化作用, Glu380 是接触反应部位(Glu186)的配对物。Totsuka 和 Fukazawa (1996)在

图 1 β -淀粉酶蛋白的三维结构示意

根据 <http://www.brouw-bier.nl/theorie/chemie/enzymen.htm> 改画。

收稿 2007-12-11 修定 2008-03-06

资助 国家自然科学基金(30471049)和江苏省青年科技创新人才项目(BK2004417)。

* 通讯作者(E-mail: wbshenh@njau.edu.cn; Tel: 025-84396542)。

此基础上提出了 β -淀粉酶催化降解底物的假说: 位于桶状核心活性位点 Glu186 和 Glu380 附近的 Leu383 在催化反应时插入环糊精形成包合体, 以维持活性位点与底物结合的稳定性, 从而有利于催化反应的进行。

Li 等(2002)利用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析栽培种大麦, 把3个 β -淀粉酶基因—— β -*amy1*, 2和3分别定位到染色体IV、II和IV中。此外, 通过研究发现蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus* bacteria, BCB)和大豆 β -淀粉酶具有不同的最适pH(分别为pH 6.7和pH 5.4)。经X-射线分析发现, BCB野生型的Glu367被2个水分子(W1和W2)所包围, W1以氢键与Glu367和Tyr164相连呈链状, 并表明一个以水为媒介的氢键转接网络Glu367...W1...Tyr164...Thr328是野生种类BCB β -淀粉酶具有较高最适pH的原因(Hirata等2004), 初步证明了在 β -淀粉酶催化亚基与活性中心附近亚基间氢键的形成和变形与 β -淀粉酶最适pH有一定关系的推测。

2 热稳定性

β -淀粉酶主要应用于食品、发酵、纺织、制药等工业过程中。例如, β -淀粉酶在纺织业中主要用于棉布退浆, 食品工业上使淀粉水解生成葡萄糖, 啤酒生产中 β -淀粉酶则是重要的发酵酶。通常, 发酵过程中产生的热量会使体系温度升高, 从而影响酶的催化反应活性。由于 β -淀粉酶是植物淀粉降解酶中热敏感性最强的酶之一。因此, 其热稳定性在整个发酵过程中起决定作用。例如, 大麦 β -淀粉酶的热稳定性是影响啤酒酿造过程中可发酵性的重要因素。因此, 热稳定性可以用作对大麦品质性状选择的育种指标(Kaneko等2000)。根据 β -淀粉酶热稳定性的不同, β -淀粉酶大致可分为3种热稳定型: 高耐热型(A型)、中耐热型(B型)和低耐热型(C型)(Kihara等1999; Kaneko等2001, 2002), 而且它们具有明显的地理特征, 其中B型被认为是大麦属中 β -淀粉酶最基本的原型(Kaneko等2002)。

以大麦麦芽以及发育的籽粒为材料, 把麦芽中的 β -淀粉酶分为Sd1和Sd2型(Eglinton等1998), 而把籽粒中的 β -淀粉酶同工酶则分为Sdd和Sdf型。其中, Sd2还分为高热稳定型Sd2H和低温

稳定型Sd2L, 而Sd1介于两者之间。4H染色体*Bmy1*位点上的等位基因*Bmy1*-Sd1、*Bmy1*-Sd2H、*Bmy1*-Sd2L编码的3种不同类型的 β -淀粉酶Sd1、Sd2H、Sd2L表现出不同的热稳定性, 并可以明显影响大麦的麦芽品质(Eglinton等1998; Kihara等1998, 1999), 从而暗示 β -淀粉酶编码基因序列的不同可能直接影响大麦的麦芽品质。Ma等(2001)用位点诱变的方法替换 β -淀粉酶蛋白中的氨基酸残基, 发现了3种不同类型的 β -淀粉酶(Sd1、Sd2H、Sd2L)可能具有不同特性的蛋白质结构基础。其中2个氨基酸的替换(V233A和L347S)可以分别使酶热稳定性指标 T_{50} (热处理后酶活性降为原来活性50%的温度)升高1.9和2.1, 推测可能是改变了 β -淀粉酶的空间结构以及蛋白质表面与溶剂水的相互作用, 进而提高了热稳定性。进一步比较Sd1和Sd2型 β -淀粉酶的氨基酸序列, 同样也发现二者有5个氨基酸的不同, 并根据这一结果来解释不同类型 β -淀粉酶具有相异热稳定性的原因(Ma等2002)。

Kaneko等(2000)对A、B和C3种热稳定型大麦品种中 β -淀粉酶编码基因进行了分析, 发现不同类型的 β -淀粉酶基因有几乎相同的外显子, 极少数不同的外显子序列导致了氨基酸序列中几个氨基酸残基的不同; 进一步研究还发现, C型大麦品种 β -淀粉酶基因的第3号内含子中, 长度为126bp的序列可能与其热稳定性质有关。除在大麦栽培种中已有的3种热稳定型(A、B、C)外, 最近, 又发现了新的热稳定型A+、A-B、B-C和C-, 其中A+有超强的热稳定性(Zhang等2004)。此外, 在非洲发现的*Curculigo pilosa*中的 β -淀粉酶活性和热稳定性比其他植物中的 β -淀粉酶高, 其催化直链淀粉的活性比催化支链淀粉低。值得注意的是, 这种酶很像微生物的 β -淀粉酶, 能降解来自于小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)和水稻中的淀粉(Dicko等1999)。

3 突变体和遗传规律

按照作物种类的不同, 种子 β -淀粉酶可以分为两大类。第一类由于往往与胚乳中的淀粉颗粒相结合, 在萌发时直接被激活, 不需要重新合成, 被称为胚乳专一型 β -淀粉酶(endosperm-specific β -amylase)。它也是小麦属作物种子如大麦、

小麦和燕麦(*Avena sativa*)等籽粒发育和成熟过程中,形成的高含量/活性的组成型 β -淀粉酶,其重要特征是羧基末端富含甘氨酸重复序列,因此也是小麦属作物种子中主要的 β -淀粉酶,其中大麦的胚乳专一型 β -淀粉酶基因被定位于染色体IV上的 β -*amy1*位点。另一类则被称为普遍型 β -淀粉酶(ubiquitous β -amylase),是指非小麦属作物(水稻和玉米等)种子萌发过程中,在糊粉层细胞重新合成的 β -淀粉酶,而且其含量和活性较低(Wang等1996)。

目前,在大麦野生植株中发现了很多的 β -淀粉酶突变体(Zhang等1993;Saghai Maroof等1995),有趣的是,有些大麦种子中尽管未检测到 β -淀粉酶活性但也可以萌发,而另一些则具有高活性的 β -淀粉酶,暗示大麦种子 β -淀粉酶可能与萌发过程无关。进一步研究发现,水稻 β -淀粉酶缺失体品种‘日本晴’萌发正常,这也为上述推测提供了有力的证据(Saika等2005)。芬兰学者研究发现,大麦HA52系的 β -淀粉酶具有高活性和高的热稳定性(Ahokas和Manninen2000)。对HA52 β -*amy1*位点上的基因组序列分析表明, β -*amy1*基因大小为4951bp,含有1个内含子、7个外显子和6个基因间隔区(Erkkila等1998)。与其他植物中的 β -*amy1*相比,它缺失一个长度为92bp的内含子区域,该区域包括3个倒置重复、4个回文序列和7个发夹环,进一步推测这个区域可能是 β -*amy1*的负调控转录因子的结合位点,缺失可能引起 β -淀粉酶活性的升高;另外,HA52中 β -淀粉酶的氨基酸序列特异性可能也是其具有较高活性的原因。

此外,在黑麦种子中也发现了 β -淀粉酶突变体。分子定位分析证明其胚乳型 β -淀粉酶基因位于第5号染色体上。进一步利用已有的大麦胚乳型 β -淀粉酶基因探针筛选黑麦cDNA文库,从中挑选出来的3个cDNA——*pc β 1*、*pc β 2*和*pc β 3*测序后发现,*pc β 2*和*pc β 3*与*pc β 1*除了在第556位点上有一个单核苷酸不同外其余都相同。由于实验中使用的品系已经在自然状况下繁育超过20代,因此它们的差别由等位基因和杂合性决定的可能性很小,暗示黑麦中胚乳型 β -淀粉酶可能是由2个基因编码。进一步研究还发现, β -淀粉酶突变体的产生还很可能是由于与 β -淀粉酶基因表

达相关的2个基因变化有关。

4 生理功能

早期研究认为, β -淀粉酶是与 α -淀粉酶等协同作用来降解淀粉,从而为种子萌发提供能量,而来自于巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)DSM319的 β -淀粉酶则可能具有单独降解淀粉的功能(Lee等2001)。果实中可溶性糖的积累过程也十分重要,不仅是因为它是大多数植物促使动物传播种子的一种策略,而且也是影响其自身营养价值的重要因素。例如,在未成熟的香蕉(*Musa nana*)果肉中有大量的淀粉(占香蕉总淀粉的20%~25%),但在成熟期 β -淀粉酶催化下这些淀粉迅速降解为可溶性糖(Cordenunsi和Lajolo1995)。这个过程可能是通过水解(Purgatto等2001;Bassinello等2002)及磷酸解(da Mota等2002)过程实现的。

在水稻种子中 β -淀粉酶定位于糊粉层,而且在萌发期出现(Wang等1996),与此相对应出现的是总淀粉及可溶性糖增多的现象,在黄瓜子叶中也是如此(Todaka等2000)。在对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)叶片的研究中发现, β -淀粉酶具有昼夜生理周期变化,也暗示了它在淀粉降解中起一定作用(Harmer等2000)。Weise等(2004)的结论又进一步证明了此可能性,他发现在晚上,麦芽糖是借助于麦芽糖转运蛋白从叶绿体中输出的主要糖类,进一步借助于转基因和突变体证明, β -淀粉酶对于叶绿体中短暂性积累淀粉的降解更加重要。另外,在苹果(*Malus domestica*)和甘薯(*Dioscorea esculenta*)块根的研究中发现, β -淀粉酶主要分布于其功能区域,这提供证据支持在植物活细胞或至少是活营养细胞中普遍存在着催化淀粉水解的 β -淀粉酶。同时,在休眠的作物种子胚乳组织和发育过程中的苹果果实中,沉积于胚乳组织淀粉粒边缘的 β -淀粉酶也是与其细胞生理学功能紧密联系的。不过,尽管 β -淀粉酶被认为作用于淀粉链的降解,但在有些植物的亚细胞定位的研究中发现的一个促使 β -淀粉酶运输进入淀粉体的转运肽,而在一些植物 β -淀粉酶中却没有发现该序列(Van Damme等2001)。

另一方面,在不同的植物材料中发现的 β -淀粉酶活性存在着明显的差异。由于大麦 β -淀粉酶在籽粒中合成,种子萌发时不再合成,故通过测

定未发芽籽粒中的 β -淀粉酶活性水平,可评判该籽粒是否适用于啤酒酿造,因此也可作为评定品种品质的一种指标。在Beck和Ziegler(1989)的研究中, β -淀粉酶被认为是淀粉贮藏组织和营养器官中的大量贮存蛋白。免疫定位技术也证实,旋花科(Convolvulaceae)植物根茎细胞质中的 β -淀粉酶也具有植物贮存蛋白的功能(Van Damme等2001)。

5 基因表达的器官和发育特异性

在种子中存在有胚乳专一型和普遍型两种 β -淀粉酶。由于胚乳专一型 β -淀粉酶在种子萌发前已经合成,所以对于种子中 β -淀粉酶基因表达定位的研究多是指普遍型 β -淀粉酶。通常, β -淀粉酶基因的mRNA主要存在于糊粉层,而 α -淀粉酶基因的mRNA则分布在糊粉层和上皮细胞。例如,在玉米发育种子糊粉层中表达的 β -淀粉酶基因的产物是与大麦、黑麦和水稻中已知的 β -淀粉酶极为相似的多肽链,长度为488个氨基酸残基。但是,黑麦和大麦胚乳专一型 β -淀粉酶羧基末端具有的特征性的甘氨酸高度重复序列,在玉米种子 β -淀粉酶中却没有发现(Laurière等1992)。通过重组自交系来进行分子定位,发现所克隆的cDNA是位于7L染色体段83 cM位置的一段单拷贝基因,Northern印迹杂交和免疫印迹结果也表明种子萌发时 β -淀粉酶的合成是在糊粉层细胞中,而非以前认为的盾片中(Wang等1997)。

叶片和其他生长器官中的 β -淀粉酶活性类似于种子中的普遍型 β -淀粉酶,它们被证明广泛参与其中的淀粉降解过程,但绝大部分报道指出它的活性主要位于叶绿体外,在叶片中还被证实多与韧皮部结合,称韧皮部结合型 β -淀粉酶(phloem-associated β -amylase)。因此, β -淀粉酶一直被认为是与位于叶绿体细胞器的叶片淀粉代谢无关。但最近在拟南芥中发现了一种新的 β -淀粉酶基因 $ct-Bmy$,它编码的蛋白在氨基酸序列上与高等植物叶绿体外的 β -淀粉酶高度相似,经导入大肠杆菌并表达后发现其编码的蛋白具有 β -淀粉酶活性,运用绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的研究也发现该蛋白在拟南芥叶绿体内有显著积累。由 $ct-Bmy$ 启动子控制的GUS报告基因在转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片栅栏

细胞和叶柄、茎中等与维管束相关的绿色组织细胞中表达最为强烈,这种现象在幼苗和成熟植株中都存在,这是定位在叶绿体的蛋白质典型的表达特征。用整棵秧苗组化染色观察还发现,GUS活性在生长的前2周被强烈限制在子叶中,到大约4周时才出现在第一片真叶叶绿体中(Lao等1999)。Qin等(2003)也发现在生长的甘薯块根细胞质中也有 β -淀粉酶的分布。

6 基因表达的调控

6.1 生长调节物质的调控 在种子萌发中, α -淀粉酶基因表达主要受赤霉素(GA_3)调控(Lovegrove和Hooley 2000),但有趣的是, GA_3 只在萌发后期起作用(Bewley 1997; Gallardo等2002)。近期研究表明,一氧化氮(nitric oxide, NO)信号可能参与了种子萌发前期(0~12 h) β -淀粉酶基因表达的调控,而对 α -淀粉酶基因表达调控不起作用。Simontacchi等(2004)发现在高粱(*Sorghum vulgare*)种子的萌发前期会迅速出现NO释放的现象。作者所在的课题组进一步研究发现,在小麦种子萌发前期,NO可以显著提高小麦种子的萌发,同时伴随着 β -淀粉酶活性迅速激活的现象,且具有NO剂量诱导效应,但对 GA_3 的应答无关(Zhang等2005)。实验还发现,在萌发的前12 h里, GA_3 对完整种子和去胚半粒种子里的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶活性都无影响,但加入NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)后, β -淀粉酶的活性和转录本可被快速诱导,而 α -淀粉酶活性基本不受影响。进一步研究还发现,NO除了直接诱导 β -淀粉酶结合体从麦谷蛋白中释放外,还可能帮助游离态的 β -淀粉酶从小的同聚体和异聚体上解离。正是由于上述变化改变了淀粉粒周围的蛋白质基质结构,才使得淀粉粒更容易暴露出来,这样也为萌发后期受 GA_3 调控的 α -淀粉酶基因表达,并最终迅速降解淀粉粒创造条件,从而加速小麦种子的萌发进程。此外,研究还发现,在大麦、大豆、水稻和西瓜(*Citrullus vulgaris*)种子的萌发早期也存在NO对 β -淀粉酶活性迅速激活的现象,暗示NO对 β -淀粉酶的调控是普遍存在的。

Purgatto等(2001)发现在香蕉成熟过程中,吲哚乙酸(IAA)推迟了淀粉降解从而合成蔗糖的过程,并首次报道IAA可能影响 β -淀粉酶等水解酶的活性。进一步研究表明IAA不影响蔗糖合酶及

蔗糖磷酸化酶基因的转录及酶活性,但推迟了 β -淀粉酶 mRNA 转录的时间,延缓其活性的升高,这暗示 β -淀粉酶可能是淀粉降解成蔗糖过程中重要的水解酶之一。此外,在梨中也发现了 IAA 能够推迟果实成熟的现象。do Nascimento 等(2006)进一步研究发现,用一定浓度的乙烯和乙烯的抑制剂 1-甲基环丙烯(1-methylcyclopropene, 1-MCP)处理成熟香蕉果肉,发现乙烯可以促进 β -淀粉酶活性升高,降解更多的淀粉并产生可溶性糖;而 1-MCP 可以延缓甚至停止上述生理过程, β -淀粉酶几乎没有活性。用 Northern 杂交和 Western 杂交测定其表达情况发现,乙烯处理后的果肉中与未处理的相比,提前诱导 β -淀粉酶的 mRNA 和蛋白质的产生;而 1-MCP 处理后的果肉中则逆转了上述过程,暗示乙烯可能是通过影响 β -淀粉酶的表达活性,促进水果的成熟。

6.2 糖信号的调控 目前已经在植物中初步证实 β -淀粉酶的基因表达被糖信号所调控。Mita 等(1995)发现,当给离体的拟南芥莲座型叶提供充足的蔗糖时,伴随着淀粉的积累, β -淀粉酶基因的转录水平和其活性都有显著的提高。对其施加葡萄糖或果糖处理同样可以诱导 β -淀粉酶基因的表达,但甘露醇和山梨醇却不能诱导其表达。进一步研究还发现,糖诱导的 β -淀粉酶基因表达严格受光照条件的控制,例如 β -淀粉酶的活性在光照不足时会严重下降;另外,糖诱导的 β -淀粉酶基因表达在光照下不受 3-(3,4-二氯苯)-1,1-二甲基脲[3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, DCMU]或氯霉素的控制,但受放线菌酮的控制。实验还证明了蔗糖诱导 β -淀粉酶基因的表达在不同组织中均普遍存在,上述结果暗示拟南芥不同组织中 β -淀粉酶基因表达可能受碳同化物在体内的分配和库源互作的调控。同样,甘薯 β -淀粉酶基因不仅受高浓度的代谢糖(如蔗糖)的诱导,也受低浓度的聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)诱导,而且这种糖诱导的 β -淀粉酶基因表达还依赖于钙离子的信号转导(Ohto 等 1995)。

7 结语

随着分子遗传学的不断发展,有关 β -淀粉酶基因的研究也日益深入。目前发现不同大麦品种的 β -淀粉酶在表达水平、热稳定性和动力学特性上存在有明显的差异,并与麦芽品质形状紧密相

关。此外,在大麦种子休眠期,以结合态形式存在的 β -淀粉酶不仅能被内源巯基蛋白酶水解释放,也能被木瓜蛋白酶释放为游离态形式,但是两者释放 β -淀粉酶的分子量与用还原剂 β -巯基乙醇所释放的分子量相比,明显偏小(由 64 kDa 下降为 59 kDa),pI 值则偏向碱性,推测与 β -淀粉酶蛋白羧基末端的氨基酸序列被蛋白酶切除有关,但是其具体的机理还不是太清楚(Sopanen 和 Laurière 1989)。因此, β -淀粉酶的基因表达规律、修饰和激活的过程还有待于进一步证实。

另一方面,尽管已有研究表明,谷物籽粒中淀粉的降解和转运主要由 β -淀粉酶参与催化,从而为萌发提供能量,但是其具体的功能还存在有不少疑问。例如,大麦中游离和结合态 β -淀粉酶的催化能力远超过萌发的需要,这种现象的存在对于植物生长发育过程中物质能源的经济利用是难以解释的。与之相对应的, β -淀粉酶缺失体品种的种子萌发并未受到明显的影响,暗示 β -淀粉酶可能与种子萌发关系不大。此外, β -淀粉酶在活细胞中经常定位于叶绿体和质体以外,与淀粉基质在亚细胞水平上也存在有相互隔离的现象。也有证据发现一些植物组织中的 β -淀粉酶可能以类似于营养贮存蛋白或抗逆相关蛋白形式存在(Van Damme 等 2001; Kaplan 和 Guy 2004)。由于 β -淀粉酶富含赖氨酸残基,并与某些作物的冷害应答有关,提高 β -淀粉酶的活性和含量也已开始成为作物遗传改良的重要课题。因此,随着以后研究的不断深入,把生理生化、分子生物学以及正向和反向遗传学技术结合起来,将能进一步揭示 β -淀粉酶在植物细胞以及组织内的各种生理功能。

参考文献

- Ahokas H, Manninen ML (2000). Thermostabilities of grain β -amylase and β -glucanase in Finnish landrace barleys and their putative past adaptedness. *Hereditas*, 132 (2): 111~118
- Bassinello PZ, Cordenunsi BR, Lajolo FM (2002). Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. *J Agr Food Chem*, 50 (21): 5781~5786
- Beck E, Ziegler P (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 40 (1): 95~117
- Bewley JD (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9 (7): 1055~1066
- Cordenunsi BR, Lajolo FM (1995). Starch breakdown during ba-

- nana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *J Agr Food Chem*, 43 (2): 347~351
- da Mota RV, Cordenunsi BR, do Nascimento JRO, Purgatto E, Rosseto MRM, Lajolo FM (2002). Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta*, 216: 325~333
- Dicko MH, Searle-van Leeuwen MJF, Beldman G, Ouedraogo OG, Hilhorst R, Traoré AS (1999). Purification and characterization of β -amylase from *Curculigo pilosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52 (6): 802~805
- do Nascimento JRO, Júnior AV, Bassinello PZ, Cordenunsi BR, Mainardi JA, Purgatto E, Lajolo FM (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Posth Biol Tech*, 40 (1): 41~47
- Eglinton JK, Langridge P, Evans DE (1998). Thermostability variation in alleles of barley beta-amylase. *J Cereal Sci*, 28 (3): 301~309
- Erkkila MJ, Leah R, Ahokas H, Cameron-Mills V (1998). Allele-dependent barley grain β -amylase activity. *Plant Physiol*, 117 (2): 679~685
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2002). Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol*, 129 (2): 823~837
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JÁ, Kay AS (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by circadian clock. *Science*, 290 (5499): 2110~2113
- Hirata A, Adachi M, Utsumi S, Mikami B (2004). Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* β -amylase: conversion of the pH optimum from a bacterial type to a higher-plant type. *Biochemistry*, 43 (39): 12523~12531
- Kaneko T, Kihara M, Ito K (2000). Genetic analysis of β -amylase thermostability to develop a DNA marker for malt fermentability improvement in barley, *Hordeum vulgare*. *Plant Breed*, 119 (3): 197~201
- Kaneko T, Zhang WS, Ishii M, Ito K, Takeda K (2002). Differentiation and geographical distribution of β -amylase isozyme in barley. *Genet Resour Crop Evol*, 49 (6): 599~605
- Kaneko T, Zhang WS, Ito K, Takeda K (2001). Worldwide distribution of β -amylase thermostability in barley. *Euphytica*, 121 (3): 223~228
- Kang YN, Adachi M, Utsumi S, Mikami B (2004). The roles of Glu186 and Glu380 in the catalytic reaction of soybean β -amylase. *J Mol Biol*, 339 (5): 1129~1140
- Kaplan F, Guy CL (2004). β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol*, 135 (3): 1674~1684
- Kihara M, Kaneko T, Ito K (1998). Genetic variation of β -amylase thermostability among varieties of barley, *Hordeum vulgare* L., and relation to malting quality. *Plant Breed*, 117 (5): 425~428
- Kihara M, Kaneko T, Ito K, Aida Y, Takeda K (1999). Geographical variation of β -amylase thermostability among varieties of barley (*Hordeum vulgare*) and β -amylase deficiency. *Plant Breed*, 118 (5): 453~455
- Kreis M, Williamson M, Buxton B, Pywell J, Hejgaard J, Svendsen I (1987). Primary structure and differential expression of β -amylase in normal and mutant barleys. *Eur J Biochem*, 169 (3): 517~525
- Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA (1999). An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *Plant J*, 20 (5): 519~527
- Laurière C, Doyen C, Thévenot C, Daussant J (1992). β -Amylases in cereals: a study of the maize β -amylase system. *Plant Physiol*, 100 (2): 887~893
- Lee JS, Wittchen KD, Stahl C, Strey J, Meinhardt F (2001). Cloning, expression, and carbon catabolite repression of the *bamM* gene encoding β -amylase of *Bacillus megaterium* DSM319. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56 (1): 205~211
- Li CD, Langridge P, Zhang X-Q, Eckstein PE, Rosnagel BG, Lance RCM, Lefol EB, Lu M-Y, Harvey BL, Scoles GJ (2002). Mapping of barley (*Hordeum vulgare* L.) beta-amylase alleles in which an amino acid substitution determines beta-amylase isoenzyme type and the level of free beta-amylase. *J Cereal Sci*, 35 (1): 39~50
- Lovegrove A, Hooley R (2000). Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci*, 5 (3): 102~110
- Ma YF, Evans DE, Logue SJ, Langridge P (2001). Mutations of barley β -amylase that improve substrate-binding affinity and thermostability. *Mol Genet Genomics*, 266: 345~352
- Ma YF, Langridge P, Logue SJ, Evans DE (2002). A single amino acid substitution that determines IEF band pattern of barley β -amylase. *J Cereal Sci*, 35 (1): 79~84
- Mikami B, Degano M, Hehre EJ, Sacchettini JC (1994). Crystal structures of soybean β -amylase reacted with β -maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis. *Biochemistry*, 33 (25): 7779~7787
- Mikami B, Hehre EJ, Sato M, Katsube Y, Hirose M, Morita Y, Sacchettini JC (1993). The 2.0-Å resolution structure of soybean β -amylase complexed with α -cyclodextrin. *Biochemistry*, 32 (27): 6836~6845
- Mita S, Suzuki-Fujii K, Nakamura K (1995). Sugar-inducible expression of a gene for β -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107 (3): 895~904
- Ohto M, Hayashi K, Isobe M, Nakamura K (1995). Involvement of Ca^{2+} signaling in the sugar-inducible expression of genes coding for sporamin and β -amylase of sweet potato. *Plant J*, 7 (2): 297~307
- Purgatto E, Lajolo FM, do Nascimento JRO, Cordenunsi BR (2001). Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, 212: 823~828
- Qin Y, Wang Y, Duan CQ, Zhang DP (2003). β -Amylase is predominantly localized to plastids in the developing tuberos root of sweet potato. *Acta Bot Sin*, 45 (5): 581~588
- Rorat T, Sadowski J, Grellet F, Daussant J, Delseny M (1991). Characterization of cDNA clones for rye endosperm β -amylase and analysis of β -amylase deficiency in rye mutant lines. *Theor Appl Genet*, 83 (2): 257~263

- Saghai Maroof MA, Zhang Q, Biyashev R (1995). Comparison of restriction fragment length polymorphisms in wild and cultivated barley. *Genome*, 38 (2): 298~306
- Saika H, Nakazono M, Ikeda A, Yamaguchi J, Masaki S, Kanekatsu M, Nemoto K (2005). A transposon-induced spontaneous mutation results in low β -amylase content in rice. *Plant Sci*, 169: 239~244
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S (2004). Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci*, 167 (4): 839~847
- Sopanen T, Laurière C (1989). Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain. *Plant Physiol*, 89 (1): 244~249
- Todaka D, Matsushima H, Morohashi Y (2000). Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons. *J Exp Bot*, 51 (345): 739~745
- Totsuka A, Fukazawa C (1996). Functional analysis of Glu380 and Leu383 of soybean β -amylase. *Eur J Biochem*, 240: 655~659
- Van Damme EJM, Hu J, Barre A, Hause B, Baggerman G, Rouge P, Peumans WJ (2001). Purification, characterization, immunolocalization and structural analysis of the abundant cytoplasmic β -amylase from *Calystegia sepium* (hedge bindweed) rhizomes. *Eur J Biochem*, 268: 6263~6273
- Wang SM, Lue WL, Eimert K, Chen J (1996). Phytohormone-regulated β -amylase gene expression in rice. *Plant Mol Biol*, 31: 975~982
- Wang SM, Lue WL, Wu SY, Huang HW, Chen J (1997). Characterization of a maize β -amylase cDNA clone and its expression during seed germination. *Plant Physiol*, 113 (2): 403~409
- Weise SE, Weber APM, Sharkey TD (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*, 218 (3): 474~482
- Yoshigi N, Okada Y, Sahara H, Koshino S (1994). PCR cloning and sequencing of the β -amylase cDNA from barley. *J Biochem*, 115 (1): 47~51
- Zhang H, Shen WB, Zhang W, Xu LL (2005). A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta*, 220 (5): 708~716
- Zhang Q, Saghai Maroof MA, Kleinhofs A (1993). Comparative diversity analysis of RFLPs and isozymes within and among populations of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Genetics*, 134 (3): 909~916
- Zhang WS, Kaneko T, Takeda K (2004). β -Amylase variation in wild barley accessions. *Breed Sci*, 54 (1): 41~49