

# 흰쥐 소장 점막 phytase의 특성 및 활성화에 미치는 금속 이온의 영향

양원진<sup>†</sup> · 손흥대\*

동아대학교 유전공학연구소  
\*동아대학교 생명자원과학대학 농생물학과

## Characterization and Effect of Metal Ion on Activity of Phytase from Rat Intestinal Mucosa

Won-Jin Yang<sup>†</sup> and Hung-Dae Sohn\*

*Institute of Genetic Engineering and Dept. of Agricultural Biology, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea*

### Abstract

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase ; EC 3.1.3.8) was purified from the mucosa of rat intestinal. The molecular weight of the enzyme was determined to be 160kDa by Sephacryl S-200 gel filtration. Analysis of the purified enzyme on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) showed that it was composed of two different subunits and the molecular weight of its subunit was found to be 70kDa and 90kDa respectively, indicating that this enzyme is heterodimer. The enzyme activities were activated in the presence of MgCl<sub>2</sub>, but inhibited by ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> and EDTA.

The substrates tested, phytase showed the highest affinity for the enzyme at the physiological pH. The *K<sub>m</sub>* value for phytic acid(inositol-hexakisphosphate) was 0.31 mM at pH 7.4. Rat intestinal mucosa phytase seems to play an important in the metabolism of inositol.

*Key words* : Rat intestinal mucosa phytase, phytic acid, heterodimer, metabolism of inositol

### 서 론

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase ; EC 3.1.3.8)는 식물 종자, 어린 식물 및 곡류 등에 인산 저장물질로서 다량 존재하는 phytic acid(inositol-hexakisphosphate)<sup>1)</sup>를 inositol과 무기인산으로 가수분해하며 그리고 inositol-6-phosphate→inositol-5-phosphate의 대사 과정에 관여하는 생리적으로 중요한 효소이다. 그렇지

만 소화기관인 장내에서 금속 이온과 결합하는 성질로 인해 이들 이온의 생리적 흡수 현상을 방해하는 것으로 알려져 왔다<sup>2)</sup>. 그래서 곡류를 주식으로 하는 동양인의 경우 phytic acid를 가수분해하여 inositol과 무기인산으로 흡수·이용하는 것은 영양학적으로 매우 중요하다.

Patwardhan<sup>3)</sup>은 고등동물 소장에서 phytic acid를 탈인산화 하는 기능을 가진 효소를 phytase라고 한 이후 phytase가 독립적 효소인지 아니면 기질 비특이적인 탈인산

<sup>†</sup> Corresponding author

화 활성을 가진 불특정 phosphatase(alkaline phosphatase나 acid phosphatase)와 동일 효소인지에 대해서는 논란이 있다<sup>4-10)</sup>.

Bitar와 Reinhold(1972)<sup>4)</sup>는 phytase와 alkaline phosphatase는 별개의 효소로 보고하였지만, Willams등(1985)<sup>10)</sup>은 소의 소장에서 정제한 alkaline phosphatase는 phytase와 CaATPase활성도 포함하고 있다는 보고도 있으며, Yang등(1994)은 흰쥐 소장에서 정제한 phytase는 alkaline phosphatase활성을 포함하고 있으나 활성 부위는 서로 다르다고 보고되어 있다<sup>11-16)</sup>.

본 연구에서는 위와 같은 연구 결과들과 관련하여 고등 동물 소화기관에 있어서 phytic acid분해 기구를 규명하고자 흰쥐 소장 점막에서 phytase를 분리·정제한 후 기질 특이성, 효소 분자량, Km값 및 금속 이온 효과 등의 phytase에 대한 특성을 조사하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

실험 동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 체중이 250~300g정도 될 때까지 일정 기간 사육한 후 단두 처사하여 소장을 절취하여 차가운 생리식염수(0.9% NaCl)로 장내를 3번 세척한 후 의료용 주걱으로 소장 점막 조직을 수집하여 실험에 사용하였다.

Phytic acid(dodecasodium salt)는 Sigma사 제품(U.S.A), *p*-nitrophenyl phosphate는 Wako Pure Chemical사 제품(Japan), A goat IgG fraction of anti-rabbit IgG anti-serum은 Cappel사 제품(U.S.A), Peroxidase-anti-Peroxidase(PAP) complex는 Zymed사 제품(U.S.A), DE-52, Sephadex G-200, Sepharose CL-6B등은 Pharmacia-LKB사 제품(Sweden), Bio-Gel HT와 SDS-PAGE장치는 Bio-Rad사 제품(U.S.A)를 사용하였다. 그 외 본 실험에 사용한 모든 시약은 Sigma사, Wako사의 특급 시약을 사용하였다.

### 2. Phytase의 분리·정제

모든 작업은 4°C가 유지되는 냉장실험실에서 Yang등(1991)<sup>13)</sup>의 방법을 인용하여 다음과 같이 실험하였다.

소장 점막 30g을 Potter-Elvehjen 조직파쇄기를 이용하여 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 0.5mM

MgCl<sub>2</sub>를 함유한 10mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충용액의 20% (w/v)파쇄액으로 소장 점막을 파쇄한 후 10,000×g에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 다시 105,000×g에서 60분간 원심 분리하여 침전분획을 파쇄액으로 분산하였다. 이 분획에 n-Butanol을 소량씩 첨가하여 최종 농도를 30% (v/v)를 만들고 4°C에서 약 2시간 동안 용액을 각반시켜 준다. 그리고 난 후 이 용액을 10,000×g에서 20분간 원심분리 하여 수용성인 상층액만 채취하여 0.5mM MgCl<sub>2</sub>를 함유한 10mM Tris-HCl(pH 7.4)인 TM완충용액으로 3회에 걸쳐 투석을 한다. 그 다음에 ethanol (-20°C) 처리를 하고 다시 TM완충용액으로 투석을 한 후 조효소원을 아래와 같은 단계를 거쳐 정제하였다.

#### 1) DE-52 column chromatography

조효소원을 TM완충용액으로 미리 평형시켜둔 DE-52 column (2.5×20cm)으로 정제하였다. 흡착된 단백질을 0~0.5M NaCl 농도구배를 이용하여 30ml/h의 속도로 용출시켰다. 그 후 phytase활성이 나타난 0.12M NaCl 분획을 TM완충용액으로 투석한 후 농축하였다.

#### 2) Sephadex G-200 column chromatography

TM완충용액으로 평형시켜둔 Sephadex G-200 column (2.5×100cm)을 이용하여 단백질을 용출(20ml/h)하였다.

#### 3) Bio-Gel HT column chromatography

Bio-Gel HT column (1.25×4cm)에 흡착된 단백질을 0~0.2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도구배를 이용하여 phytase활성이 나타난 0.06M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>분획을 TM완충용액으로 투석한 후 농축하였다.

#### 4) Sepharose CL-6B column chromatography

농축된 분획을 Sepharose CL-6B column (2×100cm)을 이용하여 20ml/h의 용출 속도로 겔 여과하여 최종적으로 정제하였다.

### 3. 효소 활성 측정 및 단백질 정량

효소 활성 측정은 Yang등(1991)<sup>13)</sup>의 방법을 사용하였다. Phytase활성 측정을 위한 반응액 1ml의 조성(최종 농도)은 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 2mM sodium phytate, 3mM MgCl<sub>2</sub>와 효소액 200μl첨가하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 50μl의 30% (w/v) perchloric acid로 반응을 멈추게 한다. 그리고 난 다음 생성된 무기인산의 흡광도를

측정하였다<sup>17)</sup>. Alkaline phosphatase 활성 측정도 마찬가지로 Yang 등(1991)의 방법으로 측정하였다. 그리고 효소 활성 1U는 1분당 1 $\mu$ mol의 무기인산을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

단백질의 정량은 Lowry 등(1951)<sup>18)</sup>의 방법에 따라 측정하였으며 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)을 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선을 작성하여 정량을 하였다.

#### 4. pH의존성

Phytase 활성에 미치는 pH의 영향을 알기 위해 pH 4~7은 sodium acetate, pH 7~9.5는 Tris-HCl, pH 9~12는 CAPs-NaOH 완충 용액을 사용하여 pH 변화에 따른 효소 활성도를 측정하였다.

#### 5. 금속 이온과 EDTA의 영향

ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 등의 2가 금속 이온과 EDTA의 농도를 변화시켜 효소 용액에 각각 첨가하여 실험방법 3의 효소 활성 측정법에 따라 효소 활성도의 변화를 측정하였다.

#### 6. Km값

Phytic acid, inositol-5-phosphate, ATP(adenosine triphosphate), glucose-6-phosphate 및  $\beta$ -Glycerophosphate 등을 기질로 하여 이 기질들의 농도를 점차로 증가시키면서 pH 7.4에서 효소 활성을 측정하였고, 이 값을 Lineweaver-Burk plot하여 결정하였다.

#### 7. 분자량 측정

Phytase의 subunit 분자량 결정은 Laemmli(1970)<sup>19)</sup> 방법을 수정한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법(SDS-PAGE)으로 실시하였다. 정제된 phytase 약 10 $\mu$ g에 해당하는 효소 용액에 0.0625M Tris-HCl buffer(pH 6.8), 2% SDS(w/v), 5% 2-mecaptoethanol(v/v), 10% glycerol(w/v), 0.002% bromophenol blue(w/v)시약 20 $\mu$ l를 가하고 100 $^{\circ}$ C 물중탕에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시켰다. 이 시료와 표준 단백질시료(standard marker protein)를 4% polyacrylamide stacking gel, 7% polyacrylamide running gel로 구성된 vertical slab gel에 주입하여

stacking gel에는 20mA, running gel에는 25mA의 직류 전원을 공급하였다. 이 때 사용한 완충용액은 0.192M glycine을 포함한 0.025M Tris buffer(pH 8.3)이며 stacking gel, running gel와 tank buffer는 0.1% SDS(w/v)를 포함한 것이었다. 표준 단백질로는 myosin(200kDa),  $\beta$ -galactosidase(116.3kDa), phosphorylase b(92.5kDa), bovine serum albumin(66.2kDa), ovalbumin(45kDa)을 사용하였다.

전기영동 후에는 silver staining과 탈색 과정(Merrill 등, 1981)<sup>20)</sup>을 거쳐 표준 단백질과의 이동 거리에 비교하여 subunit의 분자량을 측정하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동(PAGE)은 효소 용액에 SDS, 2-mecaptoethanol 그리고 100 $^{\circ}$ C 물중탕 등을 제외하여 단백질이 변성되지 않도록 해서 전기영동을 하고 silver staining과 탈색 과정을 거쳐 단백질의 순도를 검출하였다.

#### 8. Phytase 항혈청 제작·분리

Phytase 항혈청 제작은 정제된 소장 phytase을 SDS-PAGE을 한 다음 90kDa 효소 단백질만을 Hager와 Burgess(1980)<sup>21)</sup> 방법으로 gel에서 추출하여 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 토끼에 주사 면역화한다. 30일 후 다시 주사 면역화하고 1주일 후에 혈액을 채취하여 DE-52 column chromatography를 이용하여 IgG만을 정제하였다(Sano 등, 1989)<sup>22)</sup>.

#### 9. Immunoblotting법

효소의 면역화학적 분석을 위해 Sano 등(1989)<sup>22)</sup>의 방법에 따라 immunoblotting을 실시하였다. 7% polyacrylamide gel인 SDS-PAGE로 단백질을 전기영동한 후 Semi-dry blotting system (sortoblot II; Sortorius, F.R.G)을 이용하여 nitro cellulose막에 단백질을 전사시킨다(Towbin 등, 1979)<sup>23)</sup>. 이 때 100mA의 직류 전원을 1시간 가량 공급하였다. 그 다음 nitro cellulose막은 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 함유한 PBS(phosphate-buffered saline)용액으로 세척을 한 후 3% BSA를 함유한 PBS용액으로 2시간 처리한다. 그리고 난 다음 phytase 항혈청(400배 희석액, 3% BSA 함유)으로 하룻밤 처리한다. 그 다음에 goat anti-rabbit IgG(400배 희석액)로 40분, 그리고 PAP(peroxidase-anti-peroxidase,

400배 희석액) 화합물로 역시 40분간 처리한 후 Tween-PBS완충용액(0.1% Tween 20을 함유한 PBS용액)으로 3번 세척한다. 그리고 nitro cellulose막을 DAB용액으로 10초에서 5분간 발색시킨 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10μl을 포함한 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4)로 반응을 멈추게 하여 효소를 검출한다. Nitro cellulose막에 이동된 표준 단백질은 10% acetic acid-45% methanol을 함유한 0.1% Amido Black으로 염색을 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. Phytase의 동정 및 분자량

흰쥐의 소화기관인 소장 점막 중의 phytase을 Yang등(1991)<sup>13)</sup>의 방법으로 정제하였다. 최종적으로 Sepharose

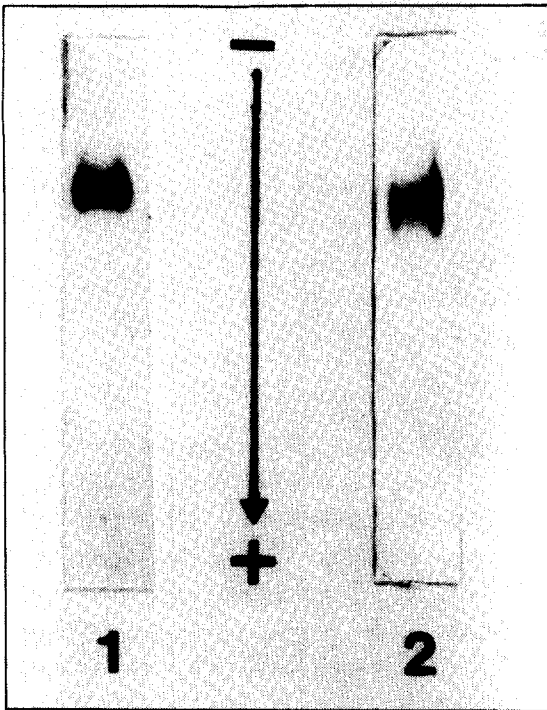


Fig. 1. Electrophoretic analyses of phytase purified from rat intestinal mucosa. Lane 1: Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) of purified phytase; Lane 2: Immunoblotting with rabbit anti-90kDa subunit antiserum as a probe was carried out after PAGE. Protein was silver-stained.

CL-6B 칼럼 크로마토그래프로 겔 여과한 결과 단일 단백질 분획과 활성 분획을 얻었다. 순도의 검정은 polyacrylamide전기영동법(PAGE)으로, 구성 서브유니트의 확인 및 분자량 측정은 SDS-PAGE와 Sephacryl S-200 겔 여과법으로 실행하였다.

정제된 효소의 PAGE결과는 단일 밴드로 나타나 균질한 상태의 효소임을 확인할 수가 있었다 (Fig. 1, Lane : 1). 소의 소장 alkaline phosphatase가 성장 발육에 따라 두개의 isozyme이 각기 발현한다는 보고<sup>24)</sup>가 있어 본 연구에서도 이 정제된 phytase의 분자량을 Sephacryl S-200 겔 여과 방법으로 측정한 결과 160kDa이었으나, 정제에 대한 순도의 확인과 함께 phytase의 서브유니트 구성을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 조사한 결과 분자량이 70kDa과 90 kDa인 두개의 밴드가 나타났으며 (Fig. 2, Lane : 1), 그리고 phytase항혈청을 이용하여 immunoblotting법으로 흰쥐 소장 점막에서 정제한 효소의 순도 검정, 서브유니트 구성 및 분자량을 조사한 결과 (Fig. 1과 2, Lane : 2) 동일한 결과가

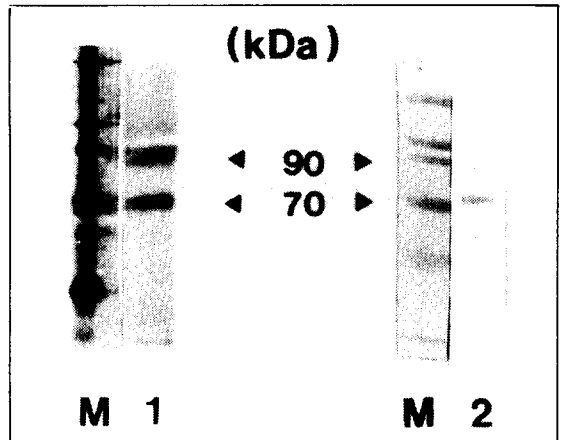


Fig. 2. Determination of subunit molecular weight of purified rat intestinal mucosa phytase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) in 7% gel(Lane 1), and immunoblotting with rabbit anti-90kDa subunit antiserum(Lane 2) as a probe was carried out after SDS-PAGE. Proteins were silver-stained. Marker proteins were as follows : myosin(200kDa), β-galactosidase(116.3 kDa), phosphorylase b(92.5kDa), bovine serum albumin(66.2kDa), ovalbumin(42kDa).

나타났다. 이와 같은 사실은 효소의 전체 분자량을 고려할 때 흰쥐 소장 점막 phytase는 분자량이 다른 두개의 서브유닛으로 구성된 heterodimer임을 알 수 있었다 (Fig. 2).

2. pH효과

Phytase의 활성화에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위하여 pH 4~12까지의 범위에 걸쳐 효소의 활성을 측정하였는데 성인기 흰쥐의 경우 생리적 pH범위인 pH 7.5에서 최고의 활성을 나타내었다. 그러나 수유 중인 유아기 흰쥐의 경우는 pH 5~8로 광범위하게 나타나는 사실로 미루어 안정된 pH범위는 존재하지 않는 것으로 추정된다(Fig. 3). 유아기 흰쥐의 경우 성인기 흰쥐보다 phytic acid에 관한 Km값이 25배정도 높아서 기질 친화력이 낮다는 보고<sup>14)</sup>와 위의 결과로서 유아기 흰쥐의 소장에 존재하는 효소의 경우 phytase활성이 아직 미완성이 상태일 것으로 생각된다.

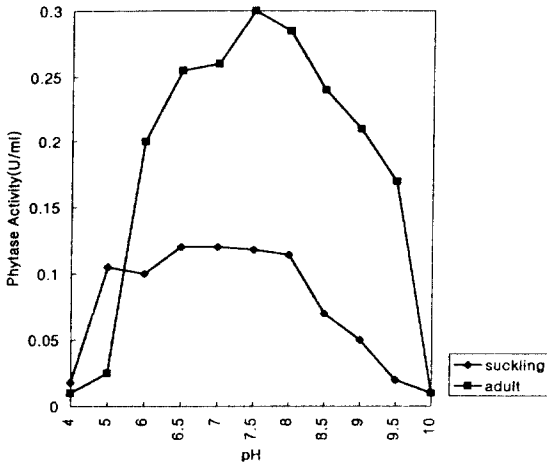


Fig. 3. Effect of pH on enzyme activities of phytase from adult and suckling rats. The activities of the purified enzyme preparation on phytic acid was determined at various pH values. The buffers used were sodium acetate (pH 4~6), Tris-HCl (pH 7~9.5), and CAPs-NaOH (pH 9~12).

3. Km값

Phytic acid를 포함한 여러 가지 인산화합물에 대한 phytase의 Km값과 Vmax값을 조사한 결과를 Table 1에 나타

내었다. 흰쥐 소장 점막 phytase는 phytic acid에 대한 Km값이 0.31mM로 가장 낮았고 그 이외의 인산화합물에 대한 Km값은 매우 높았다. 따라서 흰쥐 소장 점막에서 정제된 효소는 phytic acid를 기질로 하는 phytase임을 알 수가 있고, 게다가 여러가지 inositol화합물과도 기질 친화력을 나타내고 있는 사실로서 phytic acid를 연속적으로 탈인산화 하여 inositol을 유도하는 것으로 추정된다. 이와 같은 결과로 포유동물의 소장 점막 phytase는 inositol 대사계에 중요한 역할을 하는 효소일 가능성이 높다.

Table 1. Km values for various substrates on rat intestinal mucosa phytase. Enzyme activity of the purified phytase preparation was measured at pH 7.4, about the optimal pH for phytase activity, and Km values were determined from Lineweaver-Burk plots.

| Substrate           | Km(mM) | Vmax |
|---------------------|--------|------|
| Phytic acid         | 0.31   | 5    |
| IP <sub>5</sub>     | 0.77   | 4.5  |
| ATP                 | 2.2    | 2.5  |
| Glucose-6-phosphate | 6.7    | 2    |
| β-Glycerophosphate  | 2.86   | 0.5  |

4. 금속 이온 및 EDTA에 의한 영향

Phytase와 alkaline phosphatase 등의 탈인산화에 관여하는 효소들은 Zn<sup>2+</sup> 및 EDTA에 의해 활성이 감소하며, Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 등의 1가 이온은 효소 활성화에 영향을 주지 않는다는 보고와 그리고 alkaline phosphatase는 metalloenzyme이라는 보고가 있다.<sup>7,25-28)</sup> 본 실험에서 2가 금속 이온 및 EDTA농도 변화에 따른 phytase 활성의 변화를 조사한 결과 CaCl<sub>2</sub>의 경우는 농도의 증가에 따른 효소 활성의 변화는 대략 110% 정도의 수준에서 뚜렷한 증가는 나타나지 않았지만, MgCl<sub>2</sub>는 농도를 증가시키에 따라 효소 활성은 증가하여 3mM에서 170%로 활성을 증가시켰다. MnCl<sub>2</sub>와 ZnCl<sub>2</sub>의 경우는 농도의 증가에 따라 효소 활성을 급격히 감소시켰다. 특히 ZnCl<sub>2</sub>는 0.5mM 이상의 농도에서 매우 강하게 효소 활성을 저해하였지만 그래도 10% 정도의 활성은 남아 있었다(Fig. 4). 이러한 실험 결과는 alkaline phosphatase는 1mM ZnCl<sub>2</sub>존재 하에서는 효소 활성이 완

전히 실패 한다는 보고<sup>13)</sup>로 미루어 보아 phytase의 기질인 phytic acid이 유리의  $Zn^{2+}$ 와 chelate화로 인해 적은 활성 이나마 존재하는 것으로 생각이 된다<sup>7,25)</sup>. EDTA도  $MnCl_2$

와  $ZnCl_2$ 의 경우와 마찬가지로 효소 활성을 저해하였지만, 0.5mM~10mM EDTA 존재 하에서도 40% 정도 효소 활성이 유지되었다 (Fig. 5).

이와 같이 본 실험에서 phytase활성이 생리적 pH에서 최대치를 나타내는 결과 (Fig. 3)와  $K_m$ 값 조사 결과 여러 가지 인산화합물 중에서 phytic acid에 대해 가장 높은 친화력을 나타내는 등의 결과 (Table 1)들은 포유동물의 소장형 특이적phosphatase의 생리적 역할의 하나가 곡류에 많이 포함되어 있는 phytic acid를 inositol과 무기인산으로 가수분해하는 phytase작용임을 강하게 뒷받침한다. 그리고  $Mg^{2+}$ 를 제외한 2가 금속 이온들은 phytase활성을 저해하는 물질로 생각되므로 본 효소를 분리 정제할 적에 사용하는 완충용액 조제 시에 활성을 저해하는 2가 금속 이온 및 유기물을 첨가하지 않도록 주의할 하여야 한다.

### 요 약

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolyase ; EC 3.1.3.8)는 흰쥐 소장 점막으로부터 분리·정제 하였다.

이 정제된 효소를 Sephacryl S-200 gel filtration방법으로 측정된 분자량은 160kDa이고, 순도 및 이 효소의 서브유니트를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법(SDS-PAGE)으로 조사한 결과 서브유니트 구조는 분자량이 70kDa와 90kDa으로 구성된 heterodimer(이종이량체)임을 알 수 있었다. 그리고  $MgCl_2$  존재 하에서는 효소 활성이 증가하나  $ZnCl_2$ ,  $MnCl_2$  및 EDTA존재 하에서는 효소 활성이 저해되었다.

기질 특이성과 pH의존성을 조사한 결과 phytase는 생리적인 pH범위에서 기질인 phytic acid(inositol-hexakisphosphate)에 대해 높은 친화력을 보였다. Phytic acid에 대한  $K_m$ 값은 pH 7.4에서 0.31 mM이다. 따라서 흰쥐의 소장 점막 phytase는 주로 inositol의 대사계에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

1. Reddy, N. R., Sathe, S. K., and Sakunkhe, D. K. : Phytates in legumes and cereals, *Adv. Food Res.*, 28,

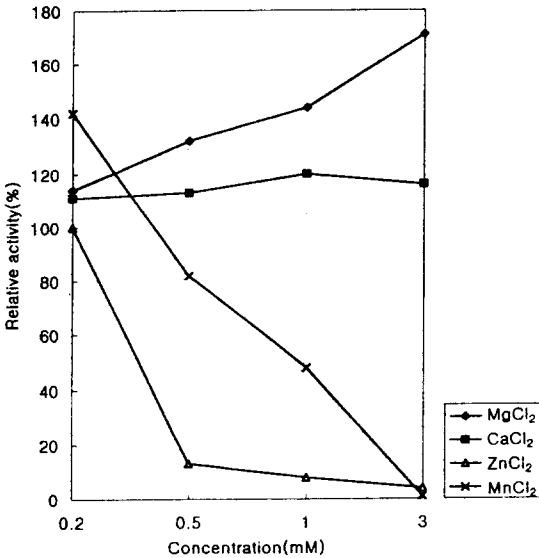


Fig. 4. Effects of metal ions on rat intestinal mucosa phytase. The activity of phytase was determined under the standard assay condition except that various concentrations of metal ions were added.

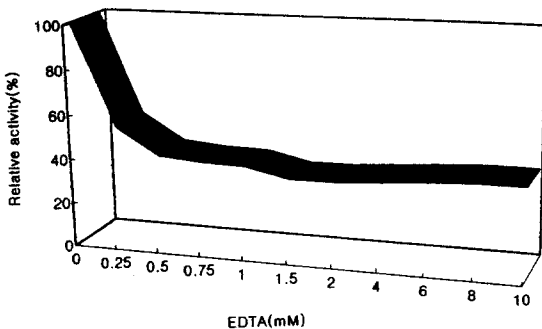


Fig. 5. Effect of EDTA on rat intestinal mucosa phytase. In the presence of various concentrations of EDTA, phytase activity was determined. The assay mixture did not contain  $MgCl_2$ , and the activity was given as relative values to the activity in the absence of EDTA.

- 1(1982).
2. Maga, J. : Phytate its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis, *J. Agric Food Chem.*, **30**, 1(1982).
3. Patwardhan, V. N. *Biochem. J.*, **31**, 560(1937).
4. Bitar, K. and Reinhold, J. G. : Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosa of rat, chicken, calf and man, *Biochim. Biophys. Acta.*, **268**, 442(1972).
5. Chan, S. D. and Atkin, S. D. : Distribution and properties of CaATPase(EC 3.6.1.3) phytase(EC 3.1.3.8) and alkaline phosphatase(EC 3.1.3.1) in isolated enterocytes from normal and vitamin D deficient rats, *Gut.*, **24**, 886(1983).
6. Davis, M. I. and Motzok, I. : Intestinal alkaline phosphatase and phytase of chicks: Separation of isoenzymes, zinc contents and *in vitro* effects of zinc, *Comp. Biochem. Physiol.*, **42B**, 345(1972).
7. Davis, N. T. and Flett, A. A. : The similarity between alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) and phytase(EC 3.1.3.8) activities in rat intestine and their importance in phytate-induced zinc deficiency, *Br. J. Nutr.*, **39**, 307(1978).
8. Gibson, D. M. and Ullah, A. H. J. : Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds, *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 503(1988).
9. Williams, P. J. and Taylor, T. G. : A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster *mesocricetus-auratus* and the laboratory rat, *Br. J. Nutr.*, **54**, 429(1985).
10. Williams, S. A., Culp, J. S., and Butler, L. G. : The relationship of alkaline phosphatase CaATPase and phytase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 10(1985).
11. 梁元鎮, 松田義宏, 中川八郎 : 랫트小腸粘膜炎의 Phytase와 Alkaline Phosphatase. *日本生化学誌.*, **61**(9), 765(1989).
12. 松田義宏, 梁元鎮, 中川八郎 : 랫트의生育及び食餌條件に伴う小腸フィターゼ(小腸型アルカリ性フォスファターゼ)의サブユニット構造의變化, *日本生化学誌.*, **62**(7), 689(1990).
13. Yang, W. J., Mastuda, Y., Sano, S., Masutani, H. and Nakagawa, H. : Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1075**, 75(1991).
14. Yang, W. J., Mastuda, Y., Inomata, M. and Nakagawa, H. : Developmental and dietary induction of the 90K subunit of rat intestinal phytase, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1075**, 83(1991).
15. Yang, W. J. and Kim, K. W. : Kinetic Properties of Rat Intestinal Phytase/Alkaline Phosphatase, *Korean. Biochem. J.*, **27**(4), 342(1994).
16. Yang, W. J. and Kim, K. W. : Characterization of oligosaccharide moieties of rat intestinal phytase, *Arch. Pharm. Res.*, **17**(5), 309(1994).
17. Heinonen, J. K. and Lahti, R. J. : A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic phosphatase, *Anal. Biochem.*, **113**, 313(1981).
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
19. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acterriophage T4, *Nature.*, **227**, 680(1970).
20. Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A. and Ebert, M. H. : Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins, *Science.*, **211**, 1437(1981).
21. Hagar, D. A. and Burgess, R. R. : Elution of Proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity : results with sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes, *Anal. Biochem.*, **109**, 76(1980).
22. Sano, S., Mastuda, Y. and Nakagawa, H. : A novel brain-specific antigen : a glycoprotein electrophoretically similar to but immunochemically different from type B nucleoside diphosphatase, *J. Biochem.*, **105**, 457(1989).
23. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350(1979).
24. Besman, M. and Coleman, J. E. : Isozymes of bovine intestinal alkaline Phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11190(1985).
25. Cooper, J. R. and Gowing, H. S. : Mammalian small intestinal phytase(EC 3.1.3.8), *Br. J. Nutr.*, **50**, 673(1983).
26. Nakabayashi, T. and Ikezawa, H. : Alkaline phosphodiesterase I release from eucaryotic plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. I. The release from rat orans, *J. Biochem.*, **99**, 703(1986).

27. Fosset, M., Chappellet-Tordo, D. and Lazdunski, M. : Intestinal alkaline Phosphatase physical properties and quaternary structure, *Biochemistry.*, 13, 1783 (1974).
28. Cathala, G., Brunel, C., Chappellet-Tordo, D. and Lazdunski, M. : Bovine kidney alkaline Phosphatase, *J. Biol. Chem.*, 250, 6040(1975).