

## 성장 발육에 따른 흰쥐 장기에 phytase의 분포성

양원진<sup>†</sup>

동아대학교 유전공학연구소

### Distribution of Phytase in The Developing Rat Organs

Won-Jin Yang<sup>†</sup>

*Institute of Genetic Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea*

#### Abstract

The phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase ; EC 3.1.3.8) activity was observed only in the homogenate of intestinal mucosa, though the activity of alkaline phosphatase was measurable in various organs. In addition, no protein bands were detected in any other organs on immunoblotting using the anti-90kDa phytase antiserum. These results suggest that phytase is specifically present in small intestinal mucosa, and that hydrolysis of phytic acid(inositol-hexakisphosphate) can be allotted for a physiological role of the intestine-specific enzyme.

The activities of phytase was increased during development of rat. The 70kDa phytase appeared just after birth, but the 90kDa phytase was not observed until adult period, suggesting that the 90kDa phytase was synthesized in response to weanling.

*Key words* : Phytase, alkaline phosphatase, intestine-specific enzyme, phytic acid, rat organs.

#### 서 론

식물에 있어서 인산저장물질인 phytic acid(inositol-hexakisphosphate)<sup>1)</sup>는 곡류, 식물 종자, 고구마 및 어린 식물 등에 많은 양이 존재하며, 이것을 섭취한 동물의 경우 인산 공급원으로 이용되어지나 금속 이온  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  등을 chelate compound하는 성질로 인해 장내에서 필수미량금속의 소화 흡수 장애로 인해 작은 체형, 빈혈, 저농도 혈청 알부민, 생식계의 발달 감퇴 및 구루병 등을 초래한다<sup>2)</sup>.

이와 같이 중요한 생리 작용을 가지고 있음에도 불구하고 현재까지 고등동물 소화기관에 있어서 phytic acid분해·흡수 기작에 관한 보고는 적다.

Inositol대사계는 아직 미규명 상태이다. inositol은 생체 내에서 glucose로부터 합성되는 경우와 곡류에 많이 포함된 phytic acid에서도 유래될 가능성이 있으나 이 양자의 관계는 아직 불분명한 상태이다<sup>3)</sup>. 그리고 inositol함유화합물(inositol-1,4,5-triphosphate, inositol-1,3,4-triphosphate, inositol-1,3,4,5-tetraphosphate)이 세포 내에서 정보 전달

<sup>†</sup> Corresponding author

에 관계하는 second messenger기능을 보유하고 있다는 사실이 주목되고 있는 이 시점에서 I-P-6(inositol hexakisphosphate) → I-P-5(inositol pentaphosphate) → I-P-4(inositol tetraphosphate) → I-P-3(inositol triphosphate)의 대사계<sup>4-6)</sup>에 관여하는 인자는 동양인의 주식인 곡류에 존재하는 phytic acid의 분해 기구 및 인산의 인체 이용면에 매우 중요한 역할을 하리라는 것이 예측된다.

그러나 inositol대사계 및 인산의 생리적 기능에 관여하는 phytic acid분해 효소인 phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8)의 정확한 역할에 대해서는 논란이 있다<sup>7-21)</sup>.

본 연구에서는 phytase의 생리적 기능의 역할을 규명하고자 흰쥐 장내 phytase의 분포성, 활성 변화와 서브유니트의 존재성 및 성장 발육에 따른 소장 점막 phytase활성과 서브유니트 변화를 조사하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

실험 동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 체중이 250~300g정도 될 때까지 일정 기간 사육한 후 단두 치사하여 소장을 절취하여 차가운 생리식염수(0.9% NaCl)로 장내를 3번 세척한 후 의료용 주걱으로 소장 점막 조직을 수집하였고, 그 외 신장, 태반, 간(kidney, placenta, liver)의 장기를 절취한 후 차가운 생리식염수로 세척하여 혈액, 지질 등을 제거하여 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 antiserum은 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

모든 작업은 4°C가 유지되는 냉장실험실에서 Yang등(1991)<sup>17)</sup>의 방법을 인용하여 다음과 같이 실험하였다.

소장 점막, 신장, 태반 및 간 등의 장기를 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 제각기의 장기 조직을 파쇄한 후 10,000×g에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 다시 105,000×g에서 60분간 원심분리하여 침전분획을 파쇄액으로 분산하였다. 이 분획에 *n*-Butanol을 소량씩 첨가하여 최종농도를 30% (v/v)를 만들고 4°C에서 약 2시간 동안 용액을 각반시켜준다. 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 조효소원으로 하여 실험에 사용하였다.

### 3. 효소 활성 측정 및 단백질 정량

효소 활성 측정은 Yang등(1991)<sup>17)</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 흡광도 증가를 측정하였다<sup>22)</sup>. Alkaline phosphatase활성 측정도 마찬가지로 Yang등(1991)의 방법<sup>17)</sup>으로 측정하였다. 효소 활성 1U는 1분당 1μmol의 무기인산을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

단백질의 정량은 Lowry등(1951)<sup>23)</sup>의 방법에 따라 측정하였으며 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선을 작성하여 정량을 하였다.

### 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Phytase의 subunit의 분자량 결정은 Laemmli(1970)<sup>24)</sup>의 방법을 수정한 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)으로 실시하였다. Phytase 약 10μg에 해당하는 조효소 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 20μl를

가하고 100°C 물중탕에서 10분간 가열하여 단백질을 변성시켰다. 이 시료와 표준 단백질(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)이었으며 stacking gel, running gel과 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.

### 5. Phytase항혈청 제작·분리

Phytase항혈청 제작은 흰쥐 소장 phytase을 SDS-PAGE을 한 다음 90kDa 효소단백질만을 Hager and Burgess (1980)<sup>26)</sup>방법으로 gel에서 추출하여 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 토끼에 주사 면역화한다. 30일 후 다시 주사 면역화 하고 1주일 후에 혈액을 채취하여 DE-52 column chromatography를 이용하여 IgG만을 정제하였다(Sano 등, 1989)<sup>27)</sup>.

### 6. Immunoblotting법

효소의 면역화학적 분석을 위해 Sano 등(1989)<sup>27)</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>28)</sup>. 이 때 100mA의 직류 전원을 1시간 가량 공급하고 그리고 난 다음에 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 처리하고 그리고 나서 phytase항혈청(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 DAB용액으

로 10초에서 5분간 발색시킨 후 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 $\mu$ l을 포함한 0.1M 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. 흰쥐의 각 장기내 Phytase의 활성 및 분포성

흰쥐 각 장기 조직의 조효소액에 있어서의 phytase 및 alkaline phosphatase(ALPase)활성도 분포의 결과는 Table 1과 같다. ALPase활성은 조사한 모든 장기에서 활성을 나타내었는데 그 중에서 소장 점막이 가장 높은 활성을 나타내었고 그 이외의 신장, 태반 및 간 조직에서는 0.11~0.008U/mg 정도의 활성을 나타내었다. 그러나 phytase활성의 경우는 소장 점막에서만 6.5mU/mg의 활성을 나타내었고, 그 이외의 장기(신장, 태반, 간)에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다.

Table 1. Organ distributions of phytase and alkaline phosphatase activities. The enzyme activities in tissue homogenates of various organs are given.

Tissue	Phytase activity (mU/mg)	ALPase activity (U/mg)
Mucosa	6.5	1.13
Kidney	N. D.	0.11
Placenta	N. D.	0.04
Liver	N. D.	0.008

ALPase, Alkaline phosphatase

N. D., not detectable

Fig. 1은 immunoblotting법으로 phytase의 장기내 분포성을 조사한 결과이다. 효소 활성도를 조사한 4가지 조직(소장 점막, 신장, 태반, 간)들을 SDS-PAGE한 후 nitro cellulose막에 단백질을 전사하고 phytase항혈청을 사용하여 면역화학적 반응성을 조사하였다. 전보에서 저자(1997)<sup>21)</sup>은 소장 점막 phytase는 분자량이 70kDa와 90kDa인 2개의 서브유니트로 구성되었다고 하였다. Fig. 1의 lane : 1

결과와 같이 소장 점막에서는 phytase의 2개의 서브유니트가 검출되었으나, 소장 점막을 제외한 신장, 태반, 간(lane : 2~4) 및 대뇌, 소뇌, 심장, 폐, 근육, 위, 대장, 고환 등의 장기에서는 phytase의 서브유니트가 전혀 검출되지 않았다 (자료 미제시).

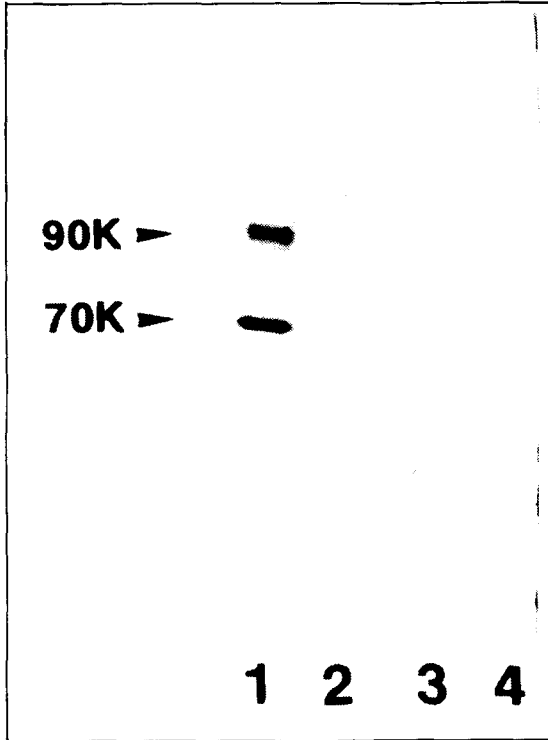


Fig 1. Detection of phytase in various organs by immunoblotting. Samples of 10µg homogenates of various organs were subjected to immunoblotting following SDS-PAGE(7%). Lane 1 : intestinal mucosa ; Lane 2 : kidney ; Lane 3 : placenta ; Lane 4 : liver.

Table 1의 결과 phytic acid를 inositol과 무기인산으로 분해하는 생리적인 기능을 가진 phytase활성은 소장에만 존재하는 것으로 생각된다. 그리고 phytase항혈청을 사용한 면역화학적 반응성 실험 (Fig. 1)을 통하여 장기내 phytase의 분포성을 조사한 결과는 phytase활성 분포성 (Table 1) 실험 결과와 동일하게 phytase의 서브유니트는 소장에서만 검

출되었고 다른 장기에서는 검출되지 않았다. 이상과 같은 실험 결과로부터 phytase는 소장에만 존재하는 소장 특이적 효소임을 알 수가 있다<sup>17,18,21</sup>.

2. 흰쥐 성장 발육에 따른 Phytase의 활성 및 서브유니트 구조의 변화

성장 발육에 따른 phytase활성의 변화를 Table 2에 표시하였다. 생후 7일째의 수유 중인 유아기 흰쥐의 phytase활성은 3.3mU/mg이나, 사육 사료를 섭취하기 시작하는 20일째의 성인기 흰쥐의 phytase활성은 6.8mU/mg으로 유아기 흰쥐의 경우보다 2배 가량 효소의 활성도가 높았다. 이와 같은 효소 활성도의 차이가 어디에서 기인하는가를 고찰 해보고, 나아가 소장 점막 phytase의 기능과 서브유니트 구조와의 관계에 대하여 추정해 보고자 immunoblotting법으로 성장 발육에 따른 phytase서브유니트 구조의 변화를 조사하였다. Phytase의 서브유니트는 분자량이 70kDa와 90kDa으로 구성된 heterodimer(Yang등, 1991, 1997)<sup>17,21</sup>라고 하였는데 수유 중인 유아기 흰쥐의 경우 70kDa phytase 만이 검출되었고 (Fig. 2, lane : 2), 수유를 마치고 사육 사료를 섭취하기 시작하는 성인기 흰쥐의 경우에는 이 70kDa phytase외에도 90kDa phytase도 함께 검출되었다 (Fig. 2, lane : 1). 이와 같은 실험 결과는 Besman과 Coleman(1985)<sup>29</sup>은 소의 소장 alkaline phosphatase를 chromatofocusing으로 조사한 결과 C-1과 C-2형이 존재하는데, C-1형은 성인기에만 존재한다는 보고와 함께 포유동물은 성장과 더불어 서브유니트 구조의 변동이 있음을 시사한다. 그리고 전보<sup>21</sup>)에서 성장에 따른 phytase활성의 pH의존성을 조사한 결과 성인기 흰쥐의 경우 생리적 pH범위인 pH 7.5이나 유아기 흰쥐의 경우 pH 5~8로 뚜렷한 pH의존성이 없었다. 게다가 기질인 phytic acid에 대한 Km치가 약 25배 정도로 큰 차이가 있었고 본 실험

Table 2. Developmental changes of phytase activities in intestinal mucosa. The intestinal mucosa were excised from suckling and adult rats. Then, phytase activities of the crude enzymes were determined.

	Phytase activity(mU/mg)
Adult rat	6.8
Suckling rat	3.3

에서도 phytase 활성도의 차이가 있었다(Table 2). 이러한 사실로서 유아기 흰쥐 소장 점막에 존재하는 70kDa 효소 단백질은 phytase기능이 아직 미완성 단계인 것으로 생각된다. 또한 흰쥐 소장에서 정제된 phytase는 alkaline phosphatase의 활성도 가지고 있으나 기질에 따라서 제각기 활성부위가 다르다는 보고(Yang등, 1994)<sup>19)</sup>와 PNPP(*p*-nitrophenyl phosphate)를 기질로 한 효소 활성을 조사한 결과 유아기와 성인기의 *K<sub>m</sub>*값이 거의 일치한다<sup>18)</sup>는 보고로서 70kDa 효소단백질은 기질인 PNPP와 결합하는 활성부위를, 90kDa 효소단백질은 이유기 이후에 기질인 phytic acid과 결합하는 활성부위를 가지도록 서브유닛 구조의 변동에 의한 것으로 추정된다.

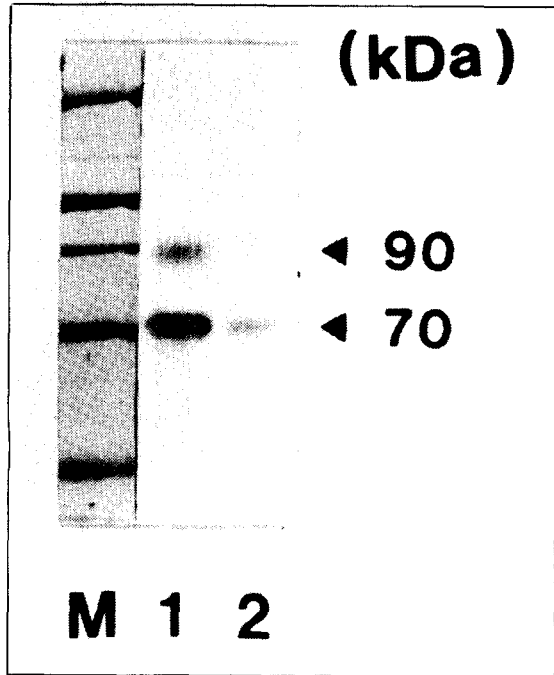


Fig. 2. Differential expression of phytase subunit during development. Samples of 10 $\mu$ g crude enzyme of the intestinal mucosa collected from suckling and adult rats of two ages were subjected to immunoblotting following SDS-PAGE(7%). Lane 1 : Adult rat phytase ; Lane 2 : Suckling rat phytase. Marker proteins were as follows : myosin (200kDa),  $\beta$ -galactosidase(116.3kDa), phosphorylase b(92.5kDa), bovine serum albumin (66.2kDa), ovalbumin(42kDa).

Moore와 Veum(1983)<sup>30)</sup>, Sandberg와 Andersson(1988)<sup>31)</sup>등은 곡류에 포함되어 있는 식물 phytase가 phytic acid의 소화에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 그렇지만 포유동물의 phytase도 곡류중의 phytic acid를 분해·흡수하는 중요한 생리적 기능을 가진다는 사실을 본 실험에서 관찰할 수 있었고 그리고 90kDa phytase는 이유기 이후의 곡류에 포함되어 있는 기질인 phytic acid를 소화하는데 필요할 것으로 생각된다.

이상과 같은 실험 결과로부터 소장 phytase활성은 흰쥐 성장과 같이 증가하고, 태아기의 소장에는 본 효소가 존재하지 않으며 유아기 소장에는 70kDa phytase만이 존재하며 이유기 이후의 성인기 소장에서 90kDa phytase가 출현한다는 사실을 알 수가 있었다. 이를테면 흰쥐 소장 점막에 존재하는 2개의 phytase 서브유닛은 흰쥐의 성장·발육 과정에서 제각기 발현하는데 70kDa phytase는 소장 조직 고유의 것으로 출생 후 항시 소장 내에 존재하지만, 90kDa phytase는 이유 후 기질 물질의 섭취에 의해서 유도되며 또 한 사료 섭취에 의한 소장미세용모 구조의 성숙과 시기를 같이해서 발현되는 것으로 추정한다.

## 요 약

Phytase(*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase ; EC 3.1.3.8)활성은 소화기관인 소장 점막에서만 나타났고, 그 외 다른 장기에서는 alkaline phosphatase활성만을 측정할 수 있었다. 그리고 anti-90kDa phytase항혈청을 이용한 면역조직학적 조사 결과 소장 이외의 장기에서는 본 효소의 단백질 밴드가 검출되지 않았다. 이와 같은 결과 phytase는 소장에만 특이적으로 존재하며, 소장 특이적 효소의 생리적 역할로서 phytic acid(*inositol*-hexakisphosphate)를 가수분해한다.

흰쥐의 성장 발육과 더불어 phytase의 활성은 증가한다. 출생 후부터 이유기 전까지는 70kDa phytase만이 검출되었으나, 성인기에서는 70kDa phytase외에도 90kDa phytase가 출현한다. 이 90kDa phytase는 이유기에 합성되는 것으로 추정된다.

## 참 고 문 헌

1. Reddy, N. R., Sathe, S. K., and Sakunkhe, D. K. :

- Phytates in legumes and cereals, *Adv. Food Res.*, **28**, 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. 中川八郎 : 腦が食べる-代謝をめぐる諸問題. 情報處理, **35**, 554(1994).
  4. Holub, B. J. : Metabolism and function of *myo*-inositol and inositol phospholipids, *Ann. Rev. Nutr.*, **6**, 563(1986).
  5. Takimoto, K., Motoyama, N. and Nakagawa, H. : Purification and properties of inositol-1,4-bisphosphate 4-phosphohydrolase from rat brain, *Biochim. Biophys. Acta.*, **929**, 327(1987).
  6. Takimoto, K., Okada, M. and Nakagawa, H. : Purification and characterization of membrane-bound inositolpolyphosphate 5-phosphatase, *J. Biochem.*, **106**, 684(1989).
  7. Patwardhan, V. N. *Biochem. J.*, **31**, 560(1937).
  8. 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).
  9. 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).
  10. 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).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 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).
  14. Williams, S. A., Culp, J. S., and Butler, L. G. : The relationship of alkaline phosphatase CaATPase and phytase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 10(1985).
  15. 梁元鎮, 松田義宏, 中川八郎 : ラット小腸粘膜のPhytaseとAlkaline Phosphatase. 日本生化学誌., **61**(9), 765(1989).
  16. 松田義宏, 梁元鎮, 中川八郎 : ラットの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)のサブユニット構造の變化 日本生化学誌., **62**(7), 689(1990).
  17. 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).
  18. 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).
  19. Yang, W. J. and Kim, K. W. : Kinetic Properties of Rat Intestinal Phytase/Alkaline Phosphatase, *Korean. Biochem. J.*, **27**(4), 342(1994).
  20. Yang, W. J. and Kim, K. W. : Characterization of oligosaccharide moieties of rat intestinal phytase, *Arch. Pharm. Res.*, **17**(5), 309(1994).
  21. 양원진, 손홍대 : 흰쥐 소장 점막 Phytase의 특성 및 활성에 미치는 금속 이온의 영향. 생명과학지, **7**(2), 119(1997).
  22. 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).
  23. 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).
  24. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, **227**, 680(1970).
  25. 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).
  26. 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).
  27. 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).
28. 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).
29. Besman, M. and Coleman, J. E. : Isozymes of bovine intestinal alkaline Phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11190(1985).
30. Moore, R. J. and Veum, T. L. : Adaptive increase in phytate digestibility by phosphorus-deprived rats and relationship of intestinal phytase(EC 3.1.3.8) and alkaline phosphatase(EC 3.1.3.1) to phytate utilization, *Br. J. Nutr.*, **49**, 145(1983).
31. Sandberg, A. -S. and Andersson, H.: Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans, *J. Nutr.* **118**, 469 (1988).