

플랑둑(*Acanthogobius hasta*) 젖산탈수소효소의 특성

염 정 주*

청주대학교 생명유전통계학부 생명과학전공

Received February 11, 2008 / Accepted February 13, 2008

Characterization of Lactate Dehydrogenase in *Acanthogobius hasta*. Jung Joo Yum*. *Department of Life Science, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea* - The lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH) isozymes in tissues from *Acanthogobius hasta* were characterized by biochemical, immunochemical and kinetic methods. The activities of LDH in skeletal muscle and eye tissues were 65.30 and 53.25 units, but LDH activities in heart and liver tissues were very low. LDH/CS (EC 4.1.3.7, citrate synthase) in skeletal muscle was the highest as 22.29. Specific activities of LDH in brain, eye and skeletal muscle were 56.45, 38.04 and 11.0 units/mg, respectively. The LDH isozymes in tissues were separated by polyacrylamide gel electrophoresis after immunoprecipitation with antiserum against A₄, B₄, eye-specific C₄ and liver-specific C₄. LDH A₄ isozymes were detected predominantly in skeletal muscle, brain and eye tissues, and B₄ isozyme was detected in heart. Anodal eye-specific C₄ and cathodal liver-specific C₄ were coexpressed in *A. hasta*. The eye-specific C₄ isozyme showed higher activity in eye tissue, but liver-specific C₄ isozyme showed lower activity in liver. As a result, one part of molecular structures in A₄ and C₄, A₄ and B₄, and eye-specific C₄ and liver-specific C₄ were similar, but in B₄ and C₄ were different with each other. Therefore the subunit A may be conservative in evolution, and the evolution of subunit B seems to be faster than that of subunit A. The LDH A₄ isozyme of skeletal muscle was purified in the fraction from elution with NAD⁺ containing buffer of affinity chromatography and eye-specific C₄ isozyme was eluted right after A₄, so the structure of eye-specific C₄ isozyme is similar to A₄. And LDH activity remained 35.22-43.47% as a result of the inhibition by pyruvate, the Michaelis-Menten constant values for pyruvate was 0.080-0.098 mM, and V_{max} were 153.85 units, 35.09 units in skeletal muscle and eye, respectively. Also the B₄ isozyme was the thermo-stablest and C₄ was stabler than A₄ isozyme. The optimum pH of LDH was 6.5. The results mentioned above indicate that isozymes in tissues showed the properties between LDH A₄ and B₄ isozyme as *A. hasta* was adapted to hypoxic conditions. Also LDH seems to function more effectively under anaerobic condition because LDH in skeletal muscle and eye tissues have high affinity for pyruvate.

Key words : *Acanthogobius hasta*, lactate dehydrogenase, eye-specific C₄ isozyme, Km, V_{max}.

서 론

생명체의 가장 흥미로운 특성중의 하나는 환경조건의 변화에 적응하는 능력이다. 생명체들은 효소의 생합성 정도를 변화하거나 활성을 조절함으로써 대사과정의 항상성을 유지할 수 있다. 어류가 저산소조건의 환경에 순응하는 과정에서 대사를 줄이거나[11] 혐기적 대사를 활성화하므로[26] 혐기적 대사에 관여하는 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27, lactate dehydrogenase, LDH)의 활성이 어떻게 변화하는지는 흥미로운 일이다. LDH 동위효소의 온도, 용존산소 및 pH에 따른 효소활성의 변화, 역학적 특성, 구조적 특성 및 기능에 관한 연구들이 어류에서 이루어졌으며[8,22,25,33] 조직에서 혐기적 대사와 호기적 대사의 정도는 LDH와 시트르산 합성효소(EC 4.1.3.7, citrate synthase, CS)의 비(LDH/CS)로 연구되었다[44]. 호기적 조건에서 피루브산은 미토콘드리아로 들어가

아세틸 CoA로 전환되고 CS에 의해 시트르산을 생성하므로 CS는 산화적 대사의 지표로 사용된다[2,29]. 그리고 젖산은 운동 중에 혐기적 대사로 인해 생성되는 노폐물로 피로를 유발한다고 알려져 왔으나 최근에 활성대사물 또는 신호화합물로서 작용하여 monocarboxylate transporter (MCT) 계를 통해 세포로 들어가 피루브산으로 전환되어 산화될 수 있고, 포도당을 형성할 수 있다는 새로운 가설이 보고되었고[37], 특히 뇌 조직에서 젖산을 주된 에너지원으로 사용한다고 보고되었다[30].

LDH는 NAD⁺-oxidoreductase로서 피루브산과 젖산의 상호전환 반응을 촉매하며 *Ldh-A*, *Ldh-B* 및 *Ldh-C* 유전자에 의한 하부단위체 A, B 및 C로 구성된 MW 140,000정도의 사량체이다[45]. LDH A₄ 동위효소는 피루브산을 젖산으로 전환하는 pyruvate reductase로서 골격근과 같은 혐기적 조직에서 우세하고 B₄ 동위효소는 젖산을 피루브산으로 전환하는 lactate oxidase로서 심장과 같은 호기적 조직에서 우세하므로, 동위효소는 대사생리학적 수준에서 적응 양상을 밝히는 좋은 수단이 되어왔다. 조직 내 피루브산 농도가 높을 경우,

*Corresponding author

Tel : +82-43-229-8527, Fax : +82-43-229-8525

E-mail : jjyum@cju.ac.kr

호기적 조직에서는 LDH B₄ 동위효소의 기능이 억제되어 젖산 축적이 제한되지만 혐기적 조직에서는 A₄ 동위효소의 활성이 증가되어 젖산이 축적된다[2]. C₄ 동위효소는 경골어류 농어목에서는 눈과 뇌 조직에서 eye-specific C₄ 동위효소가 발현되고, 잉어목의 간 조직에서는 liver-specific C₄ 동위효소가 발현되지만[40], 일부 어류 군에서는 *Ldh-C* 유전자가 발현되지 않았다[34].

따라서 여름철에 공기호흡 어류는 각 조직의 필요에 따라 LDH 동위효소를 조절하여 호기적 대사는 줄이고 혐기적 대사를 증가시켜 조절하였다[3]. 그러나 공기호흡을 하는 *Channa punctata*의 수생 호흡 유충은 공기가 부족하면 LDH A₄보다 B₄를 일시적으로 발현하고 공기호흡을 하는 성체는 공기가 부족하면 심장에서 A₄를 증가하고 B₄는 서서히 감소하였다[1]. 또한 껍지와 모래무지를 증가된 용존산소에 급격히 순응시킨 경우 골격근에서는 A₄ 동위효소가 증가되나 심장에서는 B₄가 조금 증가되어 기존의 LDH 기능에 대한 설명과 일치하지 않았고, 모래무지가 껍지에 비해 LDH 활성이 크게 증가되고 동위효소의 변화도 크게 나타났으며 C₄ 동위효소는 lactate oxidase로서 대사를 조절하였다[8]. 모래무지에서 온도를 증가했을 경우 *Ldh-A*와 *Ldh-B*만 발현되는 조직에서는 발현 정도가 큰 하부단위체가 감소하므로 골격근에서는 A₄, 심장에서는 B₄가 감소하였고, *Ldh-C*가 발현된 간 조직은 C₄를 증가시켜 조절하는 것으로 나타났다[22]. 즉 생명체가 어떤 환경조건에 적응되어 진화되었는지에 따라 습성과 행동 양식이 다르고, *Ldh* 발현도 다르게 조절되어 LDH 동위효소의 일반적인 기능에 따르지 않는 것으로 볼 수 있다. 따라서 LDH 동위효소의 기능에 대해 연구하기 위해 특수한 환경에 서식하는 종을 선택하여 LDH 동위효소의 특성에 대해 살펴보고자 하였다.

본 연구에서는 기수 환경에 서식하여 물속과 물 밖의 생활에 적응되어 있는 풀망둑을 시료로 선택하였고[27], LDH 동위효소의 발현 양상을 연구하여 대사를 확인하고, LDH의 촉매적 특성과 역학적 특성을 살펴봄으로써 환경에 적응되어 진화하는 과정에서 LDH의 역할을 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 조직 추출액의 준비

농어목 망둑어과(Perciformes, Gobiidae) 풀망둑(*Acanthogobius hasta*)은 경기도 김포시 강화군 해안에서 2006년 11월 초에 26±2 cm, 91±3 g 정도 크기를 채집하여 즉시 동결시켜 실험실로 운반하였다. 풀망둑의 골격근, 심장, 눈, 뇌 및 간 조직을 떼어내어 증류수로 혈액을 충분히 제거한 다음, 시료 조직에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 4°C)를 2-3배(v/w) 가하여 얼음에 채운 glass homogenizer로 파쇄 하였다. 조직 파쇄액은 4°C, 20,000× g 에서 1시간

씩 2회 원심분리(Hitachi 20 PR-52D) 하였으며 상등액을 시료로 사용하였다.

Lactate dehydrogenase와 citrate synthase의 활성 측정 및 단백질 정량

LDH의 활성은 1.50 mM 피루브산과 0.14 mM NADH를 포함한 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.85) 3 ml에 시료를 가한 다음 NADH로 부터 NAD⁺로 산화되는 정도를 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 1 μM의 기질을 전환시키는데 필요한 효소의 양으로 millimolar extinction coefficient 6.22를 사용하여 계산하였고[45] 조직 1 g에 대한 활성으로 계산하였다. CS의 활성은 0.2 mM acetyl-CoA, 0.1 mM DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], 0.5 mM oxaloacetic acid를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 3 ml에 시료를 가한 후, DTNB가 전환되는 정도를 분광광도계를 사용하여 25°C, 412 nm에서 측정하였다. 활성의 단위(unit)는 1분 동안 1 μM의 기질을 전환시키는데 필요한 효소의 양으로 millimolar extinction coefficient 13.6을 사용하여 계산하였다[41]. 단백질은 BSA (100 μg/100 μl)를 표준단백질로 사용하여 분광광도계로 595 nm에서 정량하였고 [5] LDH의 특이활성도는 단백질 양에 대한 효소의 활성 (unit/mg)으로 나타냈다.

Native-polyacrylamide gel 전기영동 및 항원-항체반응

풀망둑 조직의 동위효소를 확인하고 진화 정도를 확인하기 위하여 골격근, 심장, 눈, 뇌 및 간 조직액에 정제한 껍지(*Coreoperca herzi*) LDH A₄ [9], 소(*Bos primigenius*) B₄, 대구(*Gadus macrocephalus*) liver-specific C₄ [36] 및 조피볼낙(*Sebastes schlegeli*) eye-specific C₄ 동위효소[6]에 대한 항혈청을 각각 1:1/2, 1:1, 1:2, 1:3(v/v) 가하고 37°C에서 60분간, 4°C에서 12시간 동안 항원-항체 반응을 시켰다. LDH 동위효소와 항체가 복합체를 형성하지 않고 상등액에 남아 있는 동위효소를 확인하기 위해 반응액을 4°C, 20,000× g에서 원심분리한 후 상등액을 native polyacrylamide gel 전기영동 하였다. 각 조직의 LDH 활성이 동일하게 되도록 시료의 양을 조절하였고, 시료에는 50% sucrose (1:1, v/v)와 0.05% bromophenol blue 용액을 가하였다. 전기영동은 polyacrylamide vertical slab system (Hoefer SE250)으로 thermostatic circulator (EYELA CA-1100)를 사용하여 4°C로 유지시키면서 실시하였다[12]. Slab gel은 7.5% acrylamide separation gel 및 2.5% acrylamide stacking gel로 만들었고, Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 100 V에서 20분간 전개시킨 후 200 V에서 130분간 전기영동 하였다. LDH는 DL-lactate, NBT, PMS 그리고 NAD⁺를 포함한 용액으로 37°C에서 염색한 후, 15% 초산용액으로 고정하여 확인하였다[45]. LDH 동위효소

의 활성 정도는 gel을 image analyzer (Viber Lourmat)로 사진을 찍은 후 분석하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

LDH A₄ 동위효소의 정제 정도를 확인하고 분자량을 측정하기 위해 Laemmli의 방법[23]에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. 10%T, 2.67%C acrylamide separation gel과 5%T, 2.67%C acrylamide stacking gel로 slab gel을 만들었다. 분자량 측정시 표준단백질로는 bovine albumin (MW 66,000), ovalbumin (MW 45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), carbonic anhydrase (MW 29,000) 및 trypsinogen (MW 24,000)을 사용하였고, 단백질을 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다.

Lactate dehydrogenase 동위효소의 정제: affinity chromatography

LDH는 affinity chromatography (Bio-Rad Econo System)에 의해 정제되었고, oxamate gel의 준비는 O'Carra의 방법[31,32]을 변형하여 실시하였다[21]. 폴망둑 골격근 조직액과 심장, 눈 및 뇌 조직을 합한 조직액에 각각 0.5 M KCl과 0.2 mM NADH를 첨가한 시료를 0.2 mM NADH를 함유한 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 6.85, 이하 buffer로 칭함)로 평형시킨 oxamate column (25×85 mm)에 각각 가하였다. 단백질이 column으로부터 용출되지 않을 때까지 0.2 mM NADH를 함유한 buffer로 씻어 준 후, 1.6 mM NAD⁺를 함유한 buffer와 buffer를 차례로 유입시키면서 용출액을 1.6 ml씩 분획하였고, 각 분획은 LDH 동위효소의 활성을 측정하고, 단백질을 정량하여 정제 그래프를 그렸다. LDH 동위효소의 활성이 있는 분획은 native polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였고, 동위효소가 확인된 분획들만 모아 Amicon (PM-10)을 사용하여 농축한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 확인하고 정제 용액으로 사용하였다.

Lactate dehydrogenase의 기질농도에 따른 저해되는 정도 측정

LDH 활성이 기질농도에 의해 저해되는 정도를 알아보기 위해 골격근, 심장, 눈 및 간 조직의 LDH와 정제한 LDH A₄ 및 eye-specific C₄의 피루브산에 대한 역학적 특성을 확인하였다. 피루브산 농도 0.1, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 7.5 및 10 mM에서 LDH 활성을 측정하였고, 최대 활성을 기준으로 상대 활성(%)을 계산하여 피루브산 농도에 따라 LDH가 저해되는 정도를 확인하였다. 또한 피루브산 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 300 및 500 μM에서 LDH 활성을 측정 후 Lineweaver-Burk plot에 의해 Km과 Vmax을 구하였다.

Lactate dehydrogenase의 열에 대한 안정성 및 최적 pH

골격근, 심장 및 눈 조직액을 60°C에서 5, 10, 15, 20, 25,

30, 40, 50, 및 60분 동안 열처리하고 4°C에서 1시간 방치시킨 후 4°C, 20,000× g에서 1시간 동안 원심분리 하여 상등액의 효소 활성을 측정 후 대조군에 대한 상대 활성(%)을 구하였다. 골격근, 심장, 눈 조직을 4°C의 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0), 0.1 M sodium citrate buffer (pH 5.5), 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.0, 6.5, 7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5, 8.0, 8.5), 0.1 M Tris-glycine buffer (pH 9.0) 및 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5, 10.0, 10.5)에서 반응시킨 후 LDH 활성을 측정하였고 최대 활성을 기준으로 상대 활성(%)을 구하였으며, 최적 pH를 확인하였다.

결과 및 고찰

Lactate dehydrogenase와 citrate synthase 활성과 단백질 정량

폴망둑 LDH의 활성은 골격근이 65.30 units로 가장 높고, 눈 조직이 53.25 units이며 간 조직에서 3.67 units로 특히 낮게 나타났다(Table 1). 어류 골격근의 LDH 활성은 100-200 units에서 참치의 백색근 5,000 units까지 다양하므로[16,18, 19] 이들과 비교시 폴망둑의 LDH 활성은 낮았다. CS의 활성은 심장이 3.66 units, 골격근 2.93 units, 눈 조직 1.84 units로 나타나 모두 낮았으며, 심장이 좀 더 호기적 대사를 하는 것으로 보이나 골격근과 큰 차이를 보이지 않았고, 눈 조직의 CS 활성은 골격근보다 낮았다(Table 1). 그러나 폴망둑 골격근의 CS 활성은 쟁쟁어 백색근 0.8-1.7 units와 적색근 1.2-2.3 units [28]보다 조금 높게 나타났고, 폐어 *Arapaima gigas*의 백색근 1.71 units, 적색근 3.3 units 및 심장 10.3 units, tuna *Katsuwonus pelamis*의 백색근 2.1 units, 적색근 21 units 및 심장 26 units [15-19]와 비교시 백색근과는 차이가 없으나 심장의 CS 활성이 특히 낮은 것이 특징적이었다. 그리고 LDH/CS는 골격근이 22.29로 가장 높고, 눈 6.41, 심장 조직 5.98로 눈 조직이 심장보다 혐기적 대사를 하는 것으로 확인되었다(Table 1). 그리고 쟁쟁어 LDH/CS는 골격근이 151.59,

Table 1. Lactate dehydrogenase activity, citrate synthase activity and protein concentration in various tissues from *Acanthogobius hasta*

Tissue	LDH activity (units)	CS activity (units)	Protein (mg/g)	LDH/CS	Specific activity (units/mg)
Skeletal muscle	65.30	2.93	5.91	22.29	11.04
Heart	21.89	3.66	2.65	5.98	8.26
Eye	53.25	8.35	1.40	6.38	38.04
Brain	28.79		0.51		56.45
Liver	3.67		0.79		4.65

눈 31.43 및 심장 17.85이고, 페어 *Arapaima gigas* 경우 백색근 153, 적색근 80, 심장 37 및 뇌 140이고, *Protpterus aethiopicus*의 백색근 306, 심장 33[13,15-19,28]이므로 이 조직들 보다 풀망둑 골격근과 심장 조직의 LDH/CS 비는 낮아 혐기적 대사 정도가 낮은 것으로 확인되었다. 단백질의 양은 골격근이 5.91, 심장 2.65, 눈 1.40, 간 0.79 및 뇌 조직이 0.51 mg이므로, LDH의 특이활성도는 뇌, 눈, 골격근, 심장 및 간 조직에서 56.45, 38.04, 11.05, 8.26, 및 4.65 units/mg로 확인되어 뇌와 눈 조직이 골격근보다 크게 나타났고 심장과 간 조직은 낮은 것으로 확인되었다. 뇌와 눈 조직에서 LDH가 촉매 하는 대사가 우세한 것으로 보이므로 뇌 조직에서 젖산을 주된 에너지원으로 사용한다는 보고[30]를 뒷받침하였다. 저 산소에 적응된 것으로 알려진 메기류중 동위효소 분화가 적은 *Hypostomus plecostomus* 경우 LDH의 특이활성도는 골격근 13.53, 심장 3.43 및 눈 2.43 units/mg이고, 5개 동위효소를 나타내는 *Pangasius polyuranodon*의 골격근은 2.18, 눈 0.11 및 심장 0.10 units/mg [7]이며, *Cyprinus carpio*의 골격근 2.65 units/mg 및 *Salmo gairdneri*의 골격근 3.95 units/mg [43]와 비교하면 풀망둑 골격근의 LDH 특이활성도가 더 높으므로 메기, 잉어 및 송어에 비해 저 산소에 적응되어져 혐기적 대사를 효율적으로 하는 것으로 볼 수 있다.

Polyacrylamide gel 전기영동과 항원-항체 반응에 의한 동위효소의 분석

LDH의 전기영동상은 *Ldh-A*와 *Ldh-B*가 발견되어 A_4 , A_3B ,

A_2B_2 , AB_3 및 B_4 로 나타나고, *Ldh-C*가 발견되는 특정 종의 눈 조직과 간 조직에서 다섯 개 동위효소 외에 여러 개의 동위효소가 확인되어 종 특이성과 조직 특이성을 나타냈다 [34,40,45]. 그러나 본 실험에서 풀망둑의 골격근, 심장, 눈, 뇌 및 간 조직을 전기영동한 결과 동위효소의 수가 적고 조직 특이성도 적게 나타났다(Fig. 1A). 동위효소를 확인하기 위해 각 조직에 대해 A_4 , B_4 , eye-specific C_4 및 liver-specific C_4 에 대한 항혈청을 면역 침강 반응시킨 후 상등액을 전기영동하였다. 골격근과 뇌 조직(Fig. 1B, C)에 A_4 에 대한 항혈청과 eye-specific C_4 에 대한 항혈청을 1:1 이상 가했을 때 LDH가 나타나지 않으므로 골격근은 A_4 , 뇌 조직은 A_4 와 A_3C 동위효소로 확인되었고, B_4 에 대한 항혈청을 1:2로 가했을 때 LDH가 나타나므로 A_4 와 C_4 의 분자구조의 일부가 유사한 것으로 볼 수 있다. 눈 조직(Fig. 1D)은 A_4 에 대한 항혈청과 1:1로 반응시 A_4 와 아래 두 밴드가 반응하여 활성이 약해졌고 음극 쪽에 나타난 밴드는 항체와 반응한 용해성 복합체로 볼 수 있으며, 1:2로 반응시 LDH가 모두 나타나지 않았다. 또한 눈 조직에 eye-specific C_4 에 대한 항혈청을 1:2로 반응시 A_4 활성만 남아 있으므로 양극쪽 밴드는 하부단위체 C를 포함한 동위효소이고, 1:3으로 반응시 밴드가 모두 없어지므로 눈 조직의 LDH는 A_4 , A_3C , A_2C_2 , AC_3 , C_4 동위효소이며, B_4 에 대한 항혈청을 반응시켰을 때 A_4 , A_3C 및 A_2C_2 의 활성이 약해지나 C_4 활성은 남아있으므로 A_4 와 B_4 의 분자구조는 극히 일부가 유사하고 A_4 와 eye-specific C_4 의 분자구조의 일부는 유사하지만 B_4 와 C_4 는 유사하지 않은 것으로 확인되었다. 따

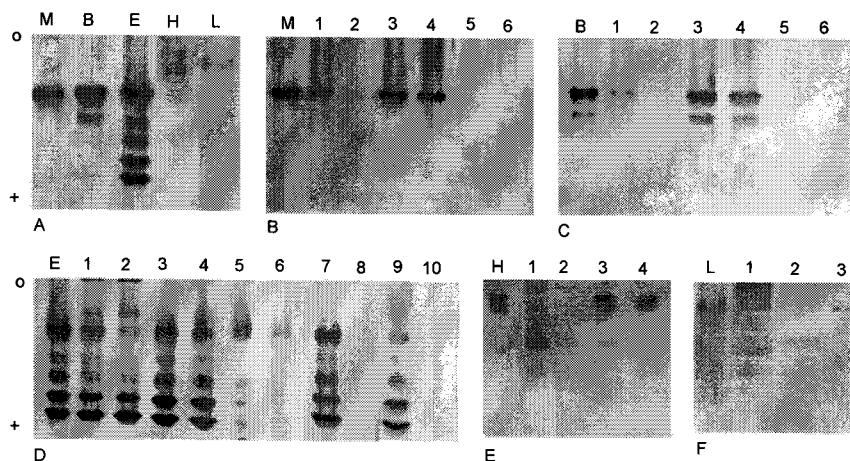


Fig. 1. Native-polyacrylamide electrophoresis zymograms of LDH isozymes in *Acanthogobius hasta* tissues after immunoprecipitation with *Coreoperca herzi* A_4 antiserum (anti- A_4), *Bos taurus* B_4 antiserum (anti- B_4), *Sebastes schlegeli* eye-specific C_4 (anti-eye C_4), and *Gadus macrocephalus* liver-specific C_4 (anti-liver C_4). A: M, Skeletal muscle; B, brain; E, eye; H, heart; L, liver. B: M, Skeletal muscle; 1, M+anti- A_4 (1:1/2); 2, M+anti- A_4 (1:1); 3, M+anti- B_4 (1:1); 4, M+anti- B_4 (1:2); 5, M+anti-eye C_4 (1:1); 6, M+anti-eye C_4 (1:2). C: B, brain; 1, B+anti- A_4 (1:1/2); 2, B+anti- A_4 (1:1); 3, B+anti- B_4 (1:1); 4, B+anti- B_4 (1:2); 5, B+anti-eye C_4 (1:1); 6, B+anti-eye C_4 (1:2). D: E, eye; 1, E+anti- A_4 (1:1/2); 2, E+anti- A_4 (1:1); 3, E+anti- B_4 (1:1); 4, E+anti- B_4 (1:2); 5, E+anti-eye C_4 (1:1); 6, E+anti-eye C_4 (1:2); 7, eye; 8, E+anti- A_4 (1:2); 9, E+anti- B_4 (1:3); 10, E+anti-eye C_4 (1:3). E: H, heart; 1, H+anti- A_4 (1:1/2); 2, H+anti- A_4 (1:1); 3, H+anti- B_4 (1:1/2); 4, H+anti- B_4 (1:1). F: L, liver; 1, L+anti-eye C_4 (1:1); 2, L+anti-eye C_4 (1:2); 3, L+anti-liver C_4 (1:1).

라서 *Ldh-C* 유전자가 조상형이고 *Ldh-A*와 *Ldh-B*를 만들었다는 보고[24,38]와 일치하였다. 또한 칠성장어 골격근 조직에서 하부단위체 A와 B의 구조가 유사하며 하부단위체 A가 보존적이고[9], 기질과 조효소가 결합하는 A₄의 활성부위의 구조가 박테리아로부터 척추동물까지 보존적이라는 결과[4]와도 일치하였다. 심장 조직(Fig. 1E)은 A₄에 대한 항혈청과 반응시 LDH 밴드가 나타나지 않았고, B₄에 대한 항혈청과 반응시 두 밴드가 남아있어 B₄와 B₃A이며, 심장의 B₄도 A₄와 유사한 것으로 나타났으며 양극 쪽에 보이는 밴드는 실험 과정에서 혈액 밴드로 확인되었다. 간 조직(Fig. 1F)은 A₄와 음극 쪽 밴드가 나타났고, eye-specific C₄에 대한 항혈청 및 liver-specific C₄에 대한 항혈청과의 반응에서 1:1로 가한 경우 liver-specific C₄의 경우가 활성이 더 약하게 확인되었으므로 liver-specific C₄이며, 1:2로 반응시 완전히 없어지므로 liver-specific C₄와 eye-specific C₄가 일부 유사하고 A₄와도 일부 유사한 것으로 확인되었고, 눈 조직의 eye-specific C₄는 활성이 크고 생리학적 기능이 뚜렷한 것으로 보이나 간 조직의 liver-specific C₄ 활성은 아주 약하게 나타났다. 어류에서 조직별 LDH의 발현 양상을 보면 조직의 대사를 알 수 있다고 보고하였다[2]. 본 실험에서 풀망둑의 LDH 동위효소가 하부단위체 A와 B의 구조가 분화되지 않아 유사한 칠성장어[9,14]보다는 분화된 것으로 보이지만 다른 종의 LDH [7,47]에 비해 특징적이고 분화가 적게 나타나고 동위효소의 일부 구조가 서로 유사하게 나타난 것은 저 산소 환경에 적응되었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 농어목에서 eye-specific C₄ 동위효소는 음하전을 띠어 양극 쪽에서 나타나고[45,46], 잉어목에서 liver-specific C₄ 동위효소는 양하전을 띠어 음극 쪽에서 나타났지만[40], 풀망둑에서는 눈 조직의 eye-specific C₄와 간 조직의 liver-specific C₄가 각각 양극과 음극에 함께 나타나므로 한 종의 두 조직에서 하전이 다르게 나타난다는 보고[20,34]와 일치하였다.

Lactate dehydrogenase 동위효소의 정제: affinity chromatography

피루브산 유사물이며 LDH에 대해 경쟁적 억제제인 oxamate를 결합시킨 sepharose gel에 LDH를 NADH와 함께 가하면 결합된다. NADH 대신 NAD⁺를 함유한 buffer를 가하면 A₄와 B₄ 동위효소는 abortive complex (E-NAD⁺-피루브산)를 형성하는 정도의 차이로 인해 oxamate에 대한 친화 정도가 다르므로 정제할 수 있다. 따라서 시료를 가한 후 0.2 mM NADH가 함유된 buffer를 유입하면 LDH를 제외한 단백질이 모두 용출되고, NAD⁺를 함유한 buffer를 유입 시 A₄ 동위효소가 용출되었고, 평형 buffer를 유입 시 B₄ 동위효소가 용출되었다. 그리고 종의 진화에 따라 LDH 하부단위체 A, B 및 C의 분화 정도가 다르므로 LDH 동위효소는 역학적 특성의 차이로 인해 affinity chromatography 상에서 다양한

정제 양상을 나타내므로 이를 비교하여 동위효소의 기능은 물론 진화상의 유연관계를 고찰할 수 있다[31,32]. 풀망둑 골격근 조직의 LDH A₄ 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer를 유입한 후 33-72번 분획(53-96 ml)에서 용출되었다(Fig. 2). 심장, 눈 및 뇌 조직을 합한 조직액의 LDH 동위효소는 NAD⁺를 함유한 buffer를 유입한 후 45-61번 분획(72-98 ml)에서 용출되었고(Fig. 3) A₄에 이어 eye-specific C₄ 동위효소가 용출되므로 eye-specific C₄가 B₄보다 A₄와 유사한 것으로 나타났다. 전기영동을 실시하여 단일밴드로 정제된 분획만 모아 농축한 후 다시 전기영동하여 골격근에서 정제한 A₄는 단일밴드로 정제되었으나 눈 조직에서 정제한 LDH는 eye-specific C₄와 C₃A가 함께 분리되었다(Fig. 4A). 그리고 골격근의 정제한 A₄ 분획은 SDS-PAGE 결과 단일 단백질로 확인되었으며 하부단위체 A의 분자량은 34,000 Da로 확인되었다(Fig. 4B).

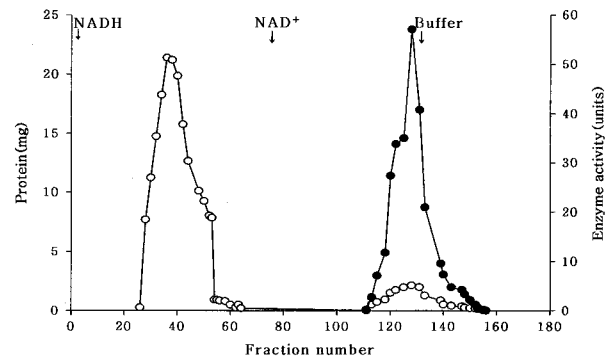


Fig. 2. Affinity chromatography of LDH isozymes in skeletal muscle from *Acanthogobius hasta* on a column (25×85 mm) of oxamate-linked sepharose gel. Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min. ○: protein concentration; ●: enzyme activity

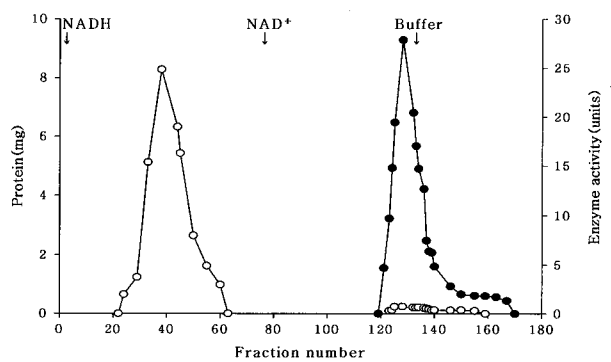


Fig. 3. Affinity chromatography of LDH isozymes in heart, eye and brain from *Acanthogobius hasta* on a column (25×85 mm) of oxamate-linked sepharose gel. Fractions of 1.6 ml were collected at a flow rate 0.4 ml/min. LDH C₄ and C₃A isozymes were found to be in the fraction numbers 123-139. ○: protein concentration; ●: enzyme activity

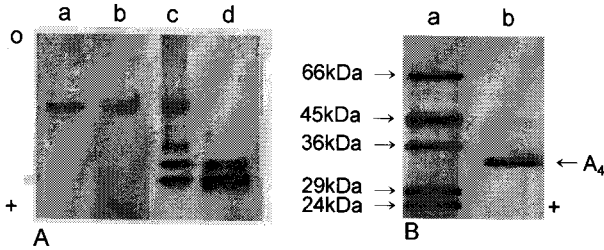


Fig. 4. A: Native-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms of LDH isozymes in *Acanthogobius hasta*. a, skeletal muscle; b, purified A₄; c, eye; d, purified C₄ and C₄. B: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis zymograms. a, marker; b, purified LDH A₄ isozyme

그리고 다른 종들의 LDH 동위효소의 affinity chromatography에서 용출되는 양상과 비교하면 NAD⁺ 유입 후 고등어 A₄는 40-56 ml [35], 생쥐 A₄는 66-92 ml [10]에서 용출되었고, buffer 유입 후 고등어 eye-specific C₄는 20-45 ml [35], 모래무지 A₄는 44-52 ml [21], 칠성장어 46-76 ml, 소 B₄는 66-72 ml [9]에서 용출되어 고등어 A₄가 분화되어 기능이 뚜렷하고, A₄와 C₄가 독립된 것으로 보고[35]되었다. 본 실험의 풀망둑의 A₄가 NAD⁺ 유입후 53-96 ml에서 확인되어 고등어 A₄와 생쥐 A₄ 사이에서 분리되었고, eye-specific C₄도 A₄에 인접해 용출되므로 고등어 eye-specific C₄와 달리 A₄와 유사하게 진화되었음을 알 수 있었다. 따라서 풀망둑 A₄ 동위효소는 고등어와 같이 분화된 종의 A₄와 B₄ 사이의 역학적 특성을 나타냈으며, buffer 유입 후 용출되는 모래무지 A₄와 칠성장어 LDH 보다 A₄의 역학적 특성에 유사하였다.

Lactate dehydrogenase의 기질의존성

LDH 동위효소의 기질에 대한 역학적 실험은 하부단위체의 분자 구조를 이해하는데 유용하다[39]. LDH 동위효소들은 피루브산에 대한 저해반응이 달라, 골격근 같은 혐기적 조직에 많이 존재하는 LDH A₄ 동위효소는 고농도의 피루브산에 의해 저해되는 정도가 낮고, 심장 및 뇌 같은 호기적 조직에 많은 B₄ 동위효소는 저농도의 피루브산을 젖산으로 전환할 때 효과적이며 고농도의 피루브산에 의해서 저해되는 정도가 크다[45]. 또한 eye-specific C₄ 동위효소는 A₄와 B₄ 동위효소의 중간 정도의 역학적 특성을 나타냈다[35]. 풀망둑 골격근, 심장, 간 및 눈 조직 LDH의 피루브산 10 mM에 대한 저해실험 결과 40.76, 37.11, 40.07 및 35.22%의 활성이 남았고, 정제된 A₄와 C₄ 동위효소는 43.47과 36.52%의 활성이 남아 있었다(Fig. 5,6). 기질에 대한 저해 반응이 조직별로 크게 차이를 보이지 않았고, 골격근과 정제된 A₄ 동위효소의 저해 정도가 유사하게 나타났으며, 눈 조직과 정제된 C₄ 동위효소도 유사하게 나타났다. 심장 조직은 B₄로 인해 저해 정도가 약간 차이를 나타냈고 간 조직도 골격근과 유사하게 나타났다. 따라서 피루브산 10 mM에서 *Bos taurus*의 B₄ 동위효

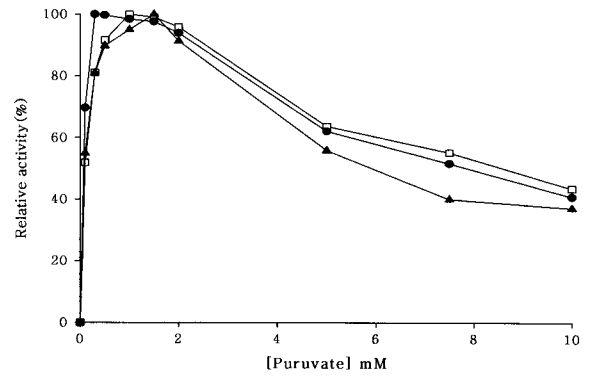


Fig. 5. Effect of pyruvate concentrations on the LDH activity in various tissues from *Acanthogobius hasta*. ●: skeletal muscle; □: A₄; ▲: heart

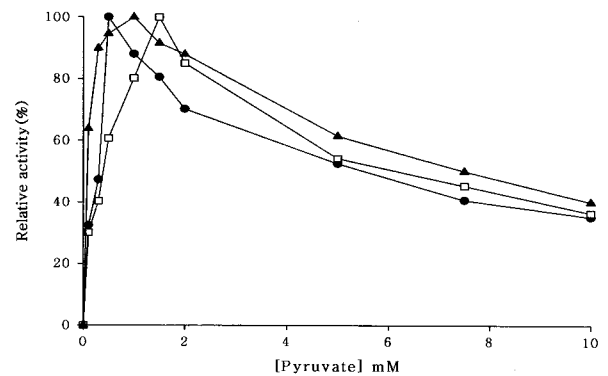


Fig. 6. Effect of pyruvate concentrations on the LDH activity in various tissues from *Acanthogobius hasta*. ●: eye, □: eye-specific C₄; ▲: liver

소는 22%, *Coreoperca herzi*의 A₄ 동위효소는 72%의 활성이 남았다는 보고[9]와 비교할 때 본 논문의 풀망둑 골격근 조직의 LDH 동위효소가 A₄와 B₄ 저해정도의 중간으로 나타났다. 풀망둑 눈 조직의 eye-specific C₄ 동위효소는 *Scombo japonicus* eye-specific C₄ 동위효소의 30%[45]와 비교할 때 저해 정도가 적게 나타나 다른 종에 비해 조직 간의 차이가 적게 나타났고, 피루브산에 의해 38.2-47.3% 활성이 남아 조직특이성이 크게 나타나지 않은 *Hypostomus plecostomus* [7]와 유사하였다. 따라서 풀망둑의 경우 기수 역에서 생활하여 저 산소 환경에 적응되어져 골격근, 심장 및 눈 조직의 LDH가 상당히 유사하게 진화되어 있는 것으로 사료된다.

또한 골격근, 심장, 눈 및 간 조직의 피루브산에 대한 Km 0.083, 0.098, 0.089 및 0.080 mM 이고 Vmax 153.85, 7.41, 35.09 및 4.55 units로 측정되어(Table 2) 피루브산에 대한 Km이 유사하고 LDH의 친화성이 큰 것으로 나타났으나 Vmax은 골격근에서 가장 크게 나타났다. 따라서 저 산소에 적응되어 있어 수면 표면에서 변형된 입술을 사용하여 호흡을 하며 골격근과 심장 LDH가 유사하게 나타나는 characin

Table 2. Apparent Michaelis-Menten constant values for lactate dehydrogenase in tissues from *Acanthogobius hasta*

Tissue	Km (mM pyruvate)	Vmax (units)
Skeletal muscle	0.083	153.85
Heart	0.098	7.41
Eye	0.089	35.09
Liver	0.080	4.55

Colossoma macropomum 골격근의 Km 0.077 mM 및 심장의 Km 0.056 mM [4]과 풀망둑 조직의 Km은 유사하지만 *cichlid Oreochromis mossambicus*의 LDH B₄ 동위효소는 Km 0.032 mM, Vmax 88 units이고 C₄ 동위효소는 Km 0.014 mM, Vmax 410 units이므로 풀망둑 심장과 눈 조직 보다 반응이 더 빠르게 이루어지는 것으로 볼 수 있고, 눈이 심장 조직 보다 친화성이 조금 큰 것과 일치하였다. 이와 같은 종들은 만성적인 저 산소에 적응되어 대사가 낮고 최적화된 산화적 대사에 의존하고 LDH와 같은 효소를 조절하는 것이다. 그러나 잉어 골격근 A₄는 Km 0.173 mM 이고 송어 골격근 A₄ 동위효소는 Km 0.209 mM 이므로 잉어가 송어보다 혐기적 조건에서 더욱 큰 활성으로 효율적으로 작용할 수 있다는 보고 [43]와 비교시 풀망둑 LDH가 피루브산에 대한 친화성이 더 크므로 풀망둑이 저산소 환경에 더욱 적응되어 혐기적 반응이 우세하게 진화된 것으로 볼 수 있다.

Lactate dehydrogenase의 열에 대한 안정성 및 최적 pH

LDH가 불활성화 되는 정도를 확인하기 위해 조직액을 60°C에서 단계 별로 60분간 열처리한 후 LDH 활성을 측정하였다(Fig. 7). 심장 조직은 5분간 열처리 시 73.50% 활성이 남았고, 골격근과 눈 조직은 5분에서 49.70%와 51.46% 활성이 남았으며 서서히 감소하여 60분간 열처리 한 경우 심장 41.59%, 눈 27.56% 및 골격근 조직 13.72% 활성이 남아, 심장 조직이 가장 열에 강한 것으로 나타났다. 본 실험에서 눈 조직의 경우 5분에서 51.46%, 10분간 열처리 시 40.28%로 나타나,

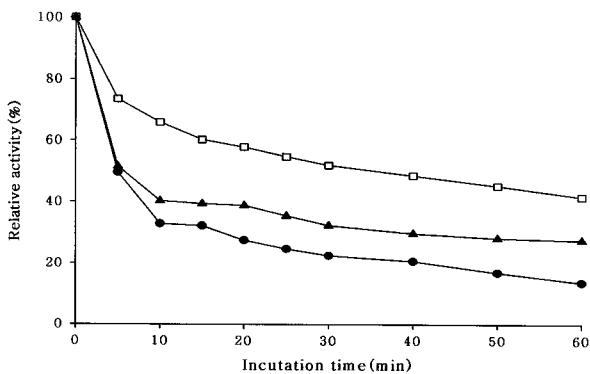


Fig. 7. Thermal inactivation of LDH in various tissues from *Acanthogobius hasta* after heat treatment at 60°C. ●: skeletal muscle; □: heart; ▲: eye

고등어 눈 조직을 10분간 열처리 시 48% 활성이 남아 있다는 보고[35]와 유사하였다. 또한 고등어 eye-specific C₄는 10분간 처리 시 94% 활성이 남아 열에 안정된 것으로 보고되어[35] 풀망둑의 눈 조직도 A₄와 C₄가 우세하고 근육 조직이 열에 약한 것으로 보아 C₄가 A₄보다 열에 강한 것이라 할 수 있으므로 B₄>C₄>A₄로 볼 수 있다. 잉어목 모래무지 LDH의 열에 대한 안정성은 B₄>C₄>A₄로 보고[21]되어 본 논문의 결과와 일치하였으나 농어목 *Geophagus brasiliensis* LDH는 눈>심장>골격근의 순서로 열에 안정하여[34] 차이를 보였다.

풀망둑 골격근과 심장의 LDH 활성은 pH 5.0에서 높은 활성을 보였으며 pH 5.5에서 활성이 감소되나 pH 6.5에서 최고의 활성을 보였고 pH 7.5 이후에 활성이 급격히 감소하였다. 눈 조직 LDH도 산성 쪽에서 낮은 활성을 나타내고 pH 6.0에서 활성이 증가되어 pH 6.5에서 최고의 활성을 보이거나 pH 7.5부터 활성이 급격히 감소하였다. 따라서 골격근, 심장 및 눈 조직에서 LDH는 최적 pH 6.5로 나타났으며 pH 5-7에서 안정하였고 염기성에서는 거의 활성을 나타내지 않았다(Fig. 8). 따라서 풀망둑 LDH의 최적 pH는 모래무지 골격근 LDH의 최적 pH 6.5[48], *Electrophorus electricus*의 A₄ 동위효소의 pH 6.5[42]와 유사하게 측정되었고, *Lampetra japonica* 골격근 LDH의 최적 pH 5.5이고 염기성에서 활성이 감소한다는 보고 및 썩뚫어 심장 LDH가 pH 5.0과 8.0에서 최적 pH가 나타나 pH 5-8에서 안정되고, 염기성 pH에서 활성이 나타나지 않는 경우와 유사하였다. 그러나 *Scomber japonica* eye-specific C₄ 동위효소의 최적 pH 8.5[35]와는 차이를 나타냈다. 따라서 기수 역에 서식하여 물속과 물 밖의 생활에 적응되어 있는 풀망둑과 썩뚫어의 LDH 경우 pH 5.0과 pH 6.5에서 모두 안정되고 염기성 pH에서는 활성을 나타내지 않으므로 서식환경에 적응되어진 결과로 사료되며, 이 후에 다양한 실험 조건에서 나타나는 젖산과 피루브산의 대사 및 LDH 동위효소의 기능에 관한 연구가 이루어져야 에너지 대사에서의 LDH의 역할과 동위효소의 기능이 정확하게 밝혀질 것으로 생각된다.

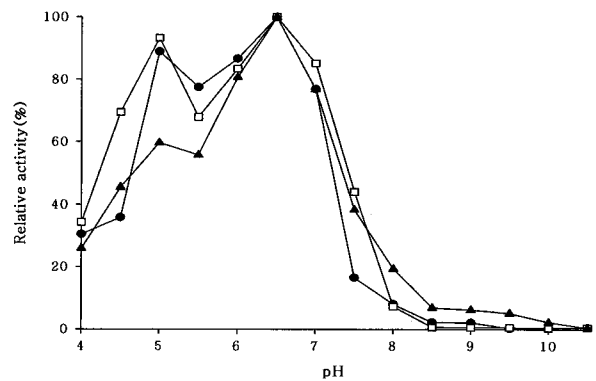


Fig. 8. Effect of pH on LDH in various tissues from *Acanthogobius hasta*. ●: skeletal muscle; □: heart; ▲: eye

요 약

플랑돔(*Acanthogobius hasta*) 조직의 젖산탈수소효소(EC 1.1.1.27. Lactate dehydrogenase, LDH) 동위효소의 특성을 생화학적, 면역화학적 및 역학적 방법에 의해 연구하였다. 플랑돔 골격근과 눈 조직의 젖산탈수소효소 활성이 65.30과 53.25 units였고, 심장과 간 조직에서는 낮게 나타났다. 골격근 조직의 LDH/CS는 22.29로 가장 높고, LDH 특이활성도는 뇌 56.45, 눈 38.04 및 골격근 11.04 units/mg였다. 각 조직에 대해 A₄, B₄, eye-specific C₄ 및 liver-specific C₄에 대한 항혈청으로 면역 침강 반응시킨 후 polyacrylamide gel 전기영동 하였다. 골격근, 뇌 및 눈 조직에서 A₄ 동위효소가 우세하게 확인되었고, 심장에서는 B₄ 동위효소가 확인되었다. 또한 양극의 eye-specific C₄와 음극의 liver-specific C₄가 한 종에서 함께 발현되었으며, 눈 조직의 eye-specific C₄는 활성이 크고 간 조직의 liver-specific C₄의 활성은 낮게 나타났다. 결과 A₄와 C₄, A₄와 B₄ 및 eye-specific C₄와 liver-specific C₄의 분자구조의 일부가 서로 유사하지만 B₄와 C₄의 구조는 서로 다른 것으로 나타났으므로 하부단위체 A는 보존적이고 하부단위체 B는 하부단위체 A보다 빠르게 진화된 것으로 사료된다. 골격근 조직의 LDH A₄ 동위효소는 affinity chromatography에서 NAD⁺를 함유한 buffer를 유입한 후 용출된 분획에서 정제되었고, eye-specific C₄ 동위효소는 A₄ 분획에 이어 용출되었으므로 eye-specific C₄가 A₄의 분자 구조와 유사한 것으로 보인다. 그리고 LDH에 대한 피루브산의 저해 실험 결과 35.22-43.47%의 활성이 남았고, Km_{pyr}은 0.080-0.098 mM 이고 골격근과 눈 조직의 Vmax은 153.85와 35.09 units였다. 또한 B₄ 동위효소가 열에 대해 가장 안정하였고 C₄는 A₄보다 안정하였으며, 최적 pH는 6.5로 나타났다. 본 실험 결과 플랑돔은 저 산소 환경 조건에 적응되어져 조직들의 동위효소들이 A₄와 B₄ 동위효소 사이의 특성을 나타냈고, 골격근과 눈 조직에서 피루브산에 대한 LDH의 친화력이 상당히 크므로 LDH가 혐기적 조건에서 효율적으로 기능을 하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2006-2007학년도 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의해 연구되었음.

References

- Ahmad, R. and A. Hasnain. 2005. Ontogenic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access. *Comp. Biochem. Physiol.* **140**, 271-278.
- Almeida-Val, V. M. V. and A. L. Val. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**, 21-28.
- Almeida-Val, V. M. F. and P. W. Hochachka. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. pp. 45-55, In Hochachka, P. W. and T. Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Vol. 5, Elsevier Science, Amsterdam.
- Auerbarch, G., F. Ostendorp, L. Prade, I. Komdorfer, T. Dams, R. Huber and R. Jaenicke. 1998. Lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: the crystal structure at 2.1 angstrom resolution reveals strategies for intrinsic protein stabilization. *Structure* **6**, 769-781.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cho, S. K. 2000. *Mitochondrial lactate dehydrogenase in tissues of vertebrate*. pp 88, Ph. D. Thesis Cheongju Univ., Korea.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 2004. Lactate dehydrogenase isozyme of hypoxia tropical catfish (*Pangasius polyuranodon*, *Hypostomus plecostomus*). *J. Life Sci.* **14**, 702-707.
- Cho, S. K. and J. J. Yum. 2005. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Coreoperca herzi* and *Pseudogobio esocinus* acclimated to rapid increase of dissolved oxygen. *J. Life Sci.* **15**, 71-79.
- Cho, S. K., S. Y. Park and J. J. Yum. 1993. Purification and immunochemistry of lactate dehydrogenase in *Lampetra japonica*. *Korean J. Zool.* **36**, 505-513.
- Cho, S. K., D. W. Park and J. J. Yum. 1999. Purification of lactate dehydrogenase isozymes in *Mus musculus*. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **17**, 75-81.
- Dalla Via, J., G. V. den Thillart, O. Cattani and A. de Zwaan. 1994. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*: II. Intermediary metabolism in blood, liver and muscle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 17-27.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Dunn, J. F., P. W. Hochachka, W. Davison and M. Guppy. 1983. Metabolic adjustments to diving and recovery in the african lungfish. *Am. J. Physiol.* **245**, R651-R657.
- Hardisty, M. W. 1982. Lampreys and hagfishes: analysis of cyclostome relationships. pp. 165-259, In Hardisty, M. W. and I. C. Potter (eds.), *The biology of lamprey* Vol. 4B, Academic Press, London.
- Hochachka, P. W. 1979. Cell metabolism air breathing and the origins of endothermy. pp. 253-288, In Wood, S. C. and C. Lenfant (eds.), *Evolution of respiratory processes*, Marcel Dekker, N.Y.
- Hochachka, P. W. 1980. *Living without oxygen*. pp. 181, Harvard Univ. Press. Cambridge.
- Hochachka, P. W. and W. C. Hulbert. 1978. Glycogen "seas" glycogen bodies and glycogen granules in heart and skeletal muscle of two air-breathing burrowing fishes.

- Can. J. Zool.* **56**, 774-786.
18. Hochachka, P. W., M. Guppy, K. B. Storey and W. C. Hulbert. 1978a. Metabolic biochemistry of water-vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. *Can. J. Zool.* **56**, 820-832.
 19. Hochachka, P. W., M. Guppy, K. B. Guderley, K. B. Storey and W. C. Hulbert. 1978b. Metabolic biochemistry of water-vs. air-breathing osterglossids: heart enzymes and ultrastructure. *Can. J. Zool.* **56**, 759-768.
 20. Holt, R. W. and W. S. Leibel. 1987. Coexpression of distinct eye- ad liver-specific LDH isozymes in cichlid fish. *J. Exp. Zool.* **224**, 337-343.
 21. Kim, M. O. and J. J. Yum. 1989. Purification, kinetics and immunochemistry of two homotetrameric lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus* (Cypriniformes). *Korean J. Zool.* **32**, 420-428.
 22. Kim, J. B., S. K. Kim and J. J. Yum. 2003. Changes of activities and isozymes of lactate dehydrogenase in *Pseudogobio esocinus* acclimated to acute change of temperature. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **21**, 37-44.
 23. Lammler, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
 24. Li, S. S-L., W. M. Fitch, Y-C. E. Pan and F. S. Sharief. 1983. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A₄ (muscle), B₄ (heart), and C₄ (testis). *J. Biol. Chem.* **258**, 7029-7032.
 25. Martinez, G., P. Behres and Z. Coppes. 1994. pH and temperature influences on the Km values of LDH A₄ from white muscles of two eurythermal sciaenid fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**, 645-648.
 26. Maxime, V., K. Pichavant, G. Boeuf and G. Nonnotte. 2000. Effects of hypoxia on respiratory physiology of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 51-59.
 27. Migdalski, E. C. and G. S. Fichter. 1983. Family Gobiidae. pp. 272-274, In *The fresh and salt water fishes of the world*, Greenwich House, N.Y.
 28. Moon, J. H. 2006. *Respiratory metabolism and antioxidant activities of tissues in Boleothalmus pectinirostris*. pp. 86, MS. Thesis Cheongju Univ., Korea.
 29. Moyes, C. D., O. A. Mathieu-Costello, R. W. Brill and P. W. Hochachka. 1992. Mitochondrial metabolism of cardiac and skeletal muscles form a fast (*Katsuwonus pelamis*) and a slow (*Cyprinus carpio*) fish. *Can. J. Zool.* **70**, 1246-1253.
 30. O'Brien, J., K. M. Kla, I. B. Hopkins, E. A. Malecki and M. C. McKenna. 2007. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem Res.* **32**, 597-607.
 31. O'Carra, P. and S. Barry. 1972. Affinity chromatography of lactate dehydrogenase: model studies demonstrating the potential of the technique in the mechanistic investigation as well as in the purification of multi-substrate enzymes. *FEBS Letters* **21**, 281-285.
 32. O'Carra, P., S. Barry and E. Corcoran. 1974. Affinity chromatographic differentiation of lactate dehydrogenase isozymes on the basis of differential abortive complex formation. *FEBS Letters* **43**, 163-168.
 33. Ozemyuk, O. D., O. S. Klyachko and E. S. Polosukhina. 1994. Acclimation temperature affects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* **107B**, 141-145.
 34. Panepucci, L. L. L., M. L. Schwantes and A. R. Schwantes. 1984. Loci that encode the lactate dehydrogenase in 23 species of fish belonging to the orders Cypriniformes, Siluriformes and Perciformes: adaptive features. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**, 867-876.
 35. Park, S. Y. and J. J. Yum. 1997. Purification and characterization of lactate dehydrogenase eye- and testis-specific C₄ isozyme. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **15**, 263-268.
 36. Park, S. Y., S. K. Cho and J. J. Yum. 2004. Characterization and evolutionary relationship of lactate dehydrogenase in liver of *Lampetra japonica* and liver-specific C₄ isozyme in *Gadus macrocephalus*. *J. Life Sci.* **14**, 708-715.
 37. Philp, A., A. L. Macdonald and P. W. Watt. 2005. Lactate-a signal coordination cell and systemic function. *J. Exp. Biol.* **208**, 4561-4575.
 38. Rehse, P. H. and W. S. Davidson. 1986. Evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**, 1041-1051.
 39. Sensabaugh, G. F. and N. O. Kaplan. 1972. A lactate dehydrogenase specific to the liver of gadoid fish. *J. Biol. Chem.* **247**, 585-593.
 40. Shaklee, J. B. and G. S. Whitt. 1981. Lactate dehydrogenase isozymes of Gadiform fishes: divergent patterns of gene expression indicate a heterogeneous taxon. *Copeia* **3**, 567-578.
 41. Srere, P. A., H. Brazil and L. Gonen. 1963. Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* **17**, S129-134.
 42. Torres-da Marra, J., C. B. Silva and A. Hasson-Voloch. 1986. Effect of ATP on purified L(+) lactate dehydrogenase from electric organ of *Electrophorus electricus* (L). *Int. J. Biochem.* **18**, 191-194.
 43. Tylicki, A., D. Masztaleruk, and S. Strumilo. 2006. Differences in some properties of lactate dehydrogenase from muscles of the carp *Cyprinus carpio* and trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Onto. Biochem.* **42**, 143-147.
 44. Val, A. L. and V. M. F. de Almeida-Val. 1995. Aerobic versus anaerobic pathways. pp. 148-151. In *Fishes of the amazon and their environment: physiological and biochemical aspect*, New York, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
 45. Whitt, G. S. 1970. Developmental genetics of the lactate dehydrogenase isozymes of fish. *J. Exp. Zool.* **175**, 1-36.
 46. Whitt, G. S., E. T. Millet and J. B. Shaklee. 1973. Developmental and biochemical genetics of lactate dehydrogenase isozymes in fishes. pp. 243-276, In Schroder, J. H. (eds.), *Genetics and Mutagenesis in Fish*, Spring Verlag, Berlin.
 47. Yum, J. J. and M. O. Kim. 1989. Biochemical properties of lactate dehydrogenase isozymes in *Pseudogobio esocinus*. *J. Ind. Sci. Cheongju Univ.* **7**, 151-162.