

재조합 고온성 Xylose Isomerase 처리에 의한 사포닌 및 푸코이단의 암 세포 생육저해 활성 비교

이동근, 박성환, 이상현*

Comparison of Growth Inhibitory Effects on Cancer Cells of Saponin and Fucoidan Treated with Recombinant Thermophilic Xylose Isomerase

Dong-Geun Lee, Seong-Hwan Park, and Sang-Hyeon Lee*

접수: 2013년 7월 8일 / 게재승인: 2013년 7월 31일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The gene encoding for xylose isomerase from the thermophilic bacterium *Thermotoga maritima* was cloned and recombinantly expressed in *E. coli* cells. Optimal activity was shown at 90°C and pH 8.0. Treatment of saponin by recombinant xylose isomerase increased the growth inhibitory effect against human gastric cancer (AGS) cells and human colon cancer (HT-29) cells. On the other hand, treatment of fucoidan by the enzyme could not change the growth inhibitory effect against the same cancer cells. One µg/ml of enzyme-treated saponin exhibited the same or higher growth inhibitory effect against both cancer cells compared with 100 µg/ml of enzyme-untreated saponin. These results would be useful in the development of functional food or drug.

Keywords: Cancer cells, Fucoidan, Saponin, *Thermotoga maritima*, Xylose isomerase

1. 서론

다시마와 미역 등에 함유된 푸코이단 (fucoidan)은 황산기를 가진 산성의 수용성 고분자 다당류로 점질 구조로 되어있다 [1]. 푸코이단은 다양한 기능을 가지고 있어 항혈액응고

활성 [2], 대장암 세포의 증식억제 효과 [3], 위암 세포의 증식 억제 효과 [4] 및 면역세포의 조절 [4,5] 등이 보고되고 있다.

인삼의 유효성분인 사포닌이 나타내는 생리활성으로 항암 [6], 항당뇨 [7], 심혈관계개선 [8] 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다. 한편 인삼뿌리뿐만 아니라 인삼잎에 다량 함유된 사포닌 성분의 이용에 관한 보고와 함께 [9] 길경 등에도 사포닌이 함유된 것으로 보고되고 있다 [10]. 사포닌 성분의 기능성을 증진시키기 위한 방법으로 효소처리 혹은 열처리가 이루어졌다 [11,12].

*Thermotoga maritima*는 초고온성 진정세균 (eubacteria)으로 온천과 심해 열수구에서 발견되며 55~90°C (최적 80°C) 범위에서 성장하며 [13], 포자를 생성하지 않는 그람음성의 간균이다 [14]. 이 균주의 S-adenosylhomocysteine hydrolase [15], β-N-acetylglucosaminidase [16], aldo-keto reductase [17] 등이 재조합 발현되어 재조합효소의 고온안정성과 구조 등이 보고되고 있다.

Xylose isomerase는 D-xylose ketol-isomerase (E.C. 5.3.1.5)라고도 하며 xylose를 xylulose로 전환시킨다. Xylose isomerase는 다른 오탄당과 육탄당을 기질로 이용할 수 있어 L-ribose와 L-lyxose 같은 희귀당의 생산에 이용될 수 있으며 [18], D-glucose를 D-fructose로 바꾸는 활성이 있어 고과당 (high fructose corn syrup, HFCS) 제품의 생산에 이용할 수 있다. 또한, xylose isomerase를 이용하여 식물에서 생물량의 최대 35%를 차지하는 hemicellulose의 β-1,3-xylan을 기질로 하여 D-xylose를 생산할 수 있으므로 재생에너지 분야에도 활용할 수 있다 [19]. 한편, HFCS 생산에서 과당의 농도를 높이

고 기질의 점도를 낮추어 반응속도를 높이는데 고온이 필요하므로 [20], 고온에서 사용 가능한 내열성 xylose isomerase의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 다양한 분야에서 이용 가능한 xylose isomerase 유전자를 초고온성 세균인 *Thermotoga maritima*에서 발굴하고 재조합 발현시켜 효소의 최적 활성 조건을 파악하고자 하였으며, 항암활성이 보고된 푸코이단과 사포닌을 개발된 재조합 xylose isomerase로 처리하여 암세포 생육저해 활성의 변화를 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. DNA, 시약 및 배지

고온성 xylose isomerase 유전자의 발굴을 위해 *Thermotoga maritima*의 genomic DNA (ATCC 43589D-2)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 대장균 세포(*E. coli* DH5 α)를 유전자 클로닝을 위한 숙주로 사용하였고, LB 배지(1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)와 37°C 조건에서 배양하였다. 대장균 형질전환체의 선별을 위해 ampicillin을 최종농도 100 μ g/mL가 되게 첨가한 LB 한천배지를 사용하였다. 제한효소, DNA ligation kit ver. 2는 Takara Korea (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2.2. 유전자 확보 및 클로닝

전반적인 클로닝은 Sambrook 등의 방법으로 수행하였다 [21]. *Thermotoga maritima*의 genomic DNA를 주형으로 Pyrobst DNA polymerase (Takara Korea, Seoul, Korea)를 이용하여 증폭시켰다. Vieille 등 [22]의 xylose isomerase 아미노산 서열과 *Thermotoga maritima*의 게놈서열을 참고하여 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/897906>) 제작한 프라이머인 TM_XIsomeraseE1-F (5'-CATATGGCAGAAATTTTCCCAG-3', inserted *NdeI* site underlined)와 TM_XIsomeraseE1-R (5'-GCGGCCGCCCCTCAGTCTGCTATTGCTTTC-3', inserted *NoI* site underlined)이 사용되었다. 증폭된 1.3 kb의 DNA 단편을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 연결시켜 pGEMTe-TM_XIsomeraseE11을 제작하였고, *E. coli* DH5 α 세포를 형질전환시켰다. DNA의 염기서열 확인은 Cosmo Genetech 사 (Seoul, Korea)에 의뢰하였고, 서열 분석은 DS_Gene ver. 1.5 program (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 수행하였다.

2.3. 재조합 xylose isomerase의 발현과 정제

Xylose isomerase 유전자를 포함하는 pGEMTe-TM_XIsomeraseE11을 제한효소 *NdeI*과 *NoI*으로 처리한 후 확보한 1.3 kb의 DNA 단편을 대장균 발현벡터인 pTXB1 (New England Bio-labs Inc., Beverly, MA, USA)에 연결하여 pTXB1-TM_XIsomeraseE11을 제조하였고, *E. coli* DH5 α 세포를 형질전환

시켰다. pTXB1-TM_XIsomeraseE11을 제한효소 *NdeI*과 *NoI*으로 절단하여 1.3 kb의 xylose isomerase 유전자 단편을 확인하였다.

pTXB1-TM_XIsomeraseE11으로 발현숙주인 *E. coli* BL21 (DE3) 세포를 형질전환시켰고, 획득한 재조합체를 ampicillin이 첨가된 10 mL의 LB 배지에서 배양하였다 (37°C, 12시간). 이 배양액을 ampicillin이 첨가된 1 L의 LB 배지로 37°C에서 3시간 배양한 후, IPTG를 최종농도 0.3 mM로 첨가하여 T7 promoter를 활성화시켰다. IPTG를 첨가한 후 추가로 37°C에서 3시간 배양하였고, 원심분리 (5,000 \times g, 5분)를 수행하여 세포를 수확하고 여기에 냉장한 30 mL의 칼럼 (column)완충용액 (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, 0.2% Triton X-100, 2 mM EDTA)을 첨가하였다. 초음파로 세포를 파쇄한 후 원심분리 (20,000 \times g, 20분)를 수행하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액을 미리 칼럼완충용액으로 처리된 20 mL의 chitin bead (New England Biolabs Inc.)가 들어 있는 칼럼에 통과시켰다. 칼럼을 칼럼완충용액으로 씻은 후, 칼럼완충용액에 30 mM DTT를 첨가한 분리 (cleavage)완충용액으로 4°C에서 하룻밤동안 처리하였다. 다음날 칼럼완충용액 50 mL로 단백질을 모았으며, BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 하여 BCA protein assay 용액 (Pierce Biotechnology, IL, USA)을 이용하여 단백질의 함량을 측정하였다.

2.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE는 11% polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli의 방법으로 행하였다 [23]. 효소용액을 Laemmli's sample buffer와 혼합하여 5분간 끓인 후 gel에 주입하여 전기영동을 수행하고 GelCode Blue Stain Reagent (Pierce Biotechnology)를 이용하여 단백질을 가시화하였다.

2.5. 효소의 활성측정

Xylose isomerase의 활성은 효소의 역반응을 이용하여 측정하였다 [24]. 즉, 400 mM fructose와 10 mM MnCl₂가 포함된 100 mM HEPES (pH 7.0) 완충용액 990 μ L에 효소용액 10 μ L를 첨가한 후 90°C에서 30분 동안 반응시키고, 50% trichloroacetic acid 300 μ L를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 생성된 glucose의 양은 Glucose assay kit (Sigma, USA)를 이용하여 자체 매뉴얼에 따라 측정하였다.

온도에 따른 xylose isomerase의 활성을 비교하기 위해 400 mM fructose와 10 mM MnCl₂가 포함된 100 mM HEPES (pH 7.0) 완충용액 990 μ L에 효소용액 10 μ L를 첨가한 후, 50~100°C의 온도에서 30분간 반응시키고 50% trichloroacetic acid 300 μ L를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 활성을 측정하였다.

pH에 따른 xylose isomerase의 활성을 비교하기 위해 pH 3.0~10.0의 완충용액 990 μ L에 효소용액 10 μ L를 첨가한 후, 90°C의 온도에서 30분간 반응시키고 50% trichloroacetic acid 300 μ L를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 활성을 측정하였다. 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 3.0~6.0), 50 mM Tris-

HCl 완충용액 (pH 6.0~8.0), 50 mM glycine NaOH 완충용액 (pH 8.0~10.0)을 이용하였으며 각 완충용액에 400 mM fructose와 10 mM MnCl₂를 첨가하였다.

2.6. 재조합 xylose isomerase 처리 전후의 푸코이단과 사포닌의 암세포 생육제해 활성 측정

연구에 사용된 푸코이단 (Fucoidan from *Fucus vesiculosus*, Product Code: F5631-5G)과 사포닌(Saponin from Quillaja bark, Product Code: S4521-25G)은 모두 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 사람 위암 세포주 (human gastric cancer cell line)인 AGS와 사람 대장암 세포주 (human colon cancer cell line)인 HT-29는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. AGS와 HT-29 세포주는 10% fetal bovine serum (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA)과 Penicillin-streptomycin (100 units/ml, BioWhittaker)을 포함하는 RPMI 1640 배지 (BioWhittaker)를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

푸코이단 혹은 사포닌 1 mg을 10 mM MnCl₂가 포함된 200 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 990 µL에 용해시킨 후, 재조합 xylose isomerase 효소액 (0.82 µg/µL) 10 µL를 첨가하여 70°C에서 2시간 동안 반응을 행한 후, 100°C에서 30분간 열처리하여 반응을 중지시켰다.

사람 위암 세포주 (AGS)와 사람 대장암 세포주 (HT-29)를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하여 세포현탁액을 세포배양용 96-well plate (Roche Inc., Indianapolis, IN, USA)에 180 µL씩 분주한 후, 재조합 xylose isomerase로 처리된 푸코이단 및 사포닌을 Phosphate-buffered saline (PBS, BioWhittaker)에 희석하여 20 µL씩 첨가하였다 (최종농도 0.5, 1, 5, 10, 100 µg/mL). 음성대조군 (no treatment)은 시료대신 동량의 PBS (BioWhittaker)를 첨가하였고, 효소 미처리 대조군은 효소 미처리 푸코이단 혹은 사포닌을 20 µL씩 첨가하였다 (최종농도 100 µg/mL). 시료가 처리된 세포들을 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 추가 배양한 후, 배양액을 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) (5 mg/mL in PBS) 용액을 100 µL씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO 100 µL를 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 10~15분 동안 반응시킨 후, 발색정도를 Synergy HT Multi-detection Microplate Reader (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다 [25].

3. 결과 및 고찰

3.1. *Thermotoga maritima*의 xylose isomerase 유전자 클로닝

T. maritima 균주의 DNA로부터 xylose isomerase 유전자를 확보하였다. *T. maritima*는 초고온성 혐기성 진정세균이다. *T. maritima* 유래의 xylose isomerase 유전자는 1335 bp로 구성되어 있고 444개의 아미노산을 지정한다. BLAST를 이용한

아미노산 서열의 유사도를 보면 *Thermotoga*속 (genus) 세균인 *T. naphthophila* (Accession #: YP003346639), *T. petrophila* (YP001244714), *T. neapolitana* (YP002534262)의 xylose isomerase와 95% 이상의 유사도를 보여 *Thermotoga*속에서 보존성이 높음을 확인하였다. *Thermotoga*속은 진정세균 중 보기 드문 초고온성 세균인데 Nelson 등은 *T. maritima* 유전자의 24%가 고세균의 유전자와 유사성이 높아 진화 초기의 수평적 유전자 전달 (lateral gene transfer)의 가능성을 보고하였다 [26].

한편, *T. maritima* 유래의 rhamnulose-1-phosphate aldolase [27], β-glucuronidase [28], β-1,2-mannosyltransferase [29] 등이 대장균과 식물에서 cloning 혹은 재조합발현되어 산업적 응용가능성도 타진되고 있다.

3.2. 발현과 정제

E. coli BL21 (DE3) 숙주에서 pTXB1-TM_XIIsomeraseE11 플라스미드는 재조합 xylose isomerase를 성공적으로 생산하였다 (Fig. 1). 정제된 효소의 SDS-PAGE는 분자량 49 kDa의 단일밴드를 보이는 것으로 나타났고 (Fig. 1), 이는 염기서열을 토대로 추산한 것과 일치하였다.

3.3. 온도와 pH에 따른 효소활성과 안정성

각 온도에서의 재조합 xylose isomerase의 활성을 Fig. 2A에 나타내었다. 본 연구의 조건에서는 50~70°C 구간에서의 활성의 증가속도보다 70~80°C에서의 증가속도가 컸으며 90°C에서 최적활성은 보였지만 100°C에서는 급격한 하락을 보였다. 동일한 *T. maritima* 유래의 재조합효소이지만 최적온도가 rhamnulose-1-phosphate aldolase는 65°C [27], β-glucuronidase는 80°C [28], β-1,2-mannosyltransferase는 95°C [29]로 나타나 효소에 따라 최적온도가 다른 것으로 나타났다.

각 pH에서의 재조합 xylose isomerase의 활성을 Fig. 2B에 나타내었다. 전반적으로 중성과 약염기성에서 활성이 높은 것으로 확인되었다. 사용한 완충용액과 pH 중에서 50 mM

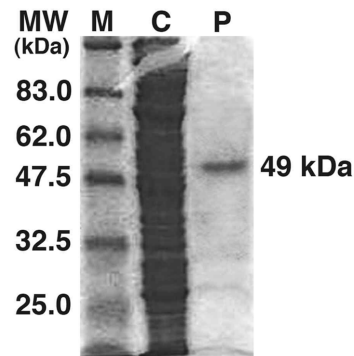


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of recombinant xylose isomerase from *E. coli* cells harboring pTXB1-TM_XIIsomeraseE11. Lane M, size markers; lane C, cell-free extract; lane P, purified enzyme by affinity chromatography. 49 kDa indicates the position of the recombinant xylose isomerase.

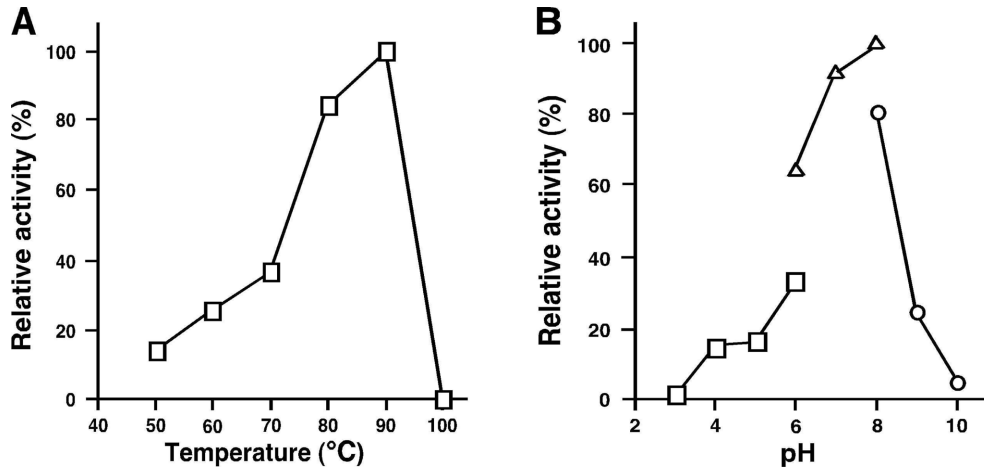


Fig. 2. Effects of temperature and pH on recombinant xylose isomerase activity. (A) Temperature dependence of enzyme activity. Values on the ordinate are shown as percentages of enzyme activity (100%) observed at 90°C. (B) pH dependence of enzyme activity. The buffers used were 50 mM sodium acetate buffer (rectangles, pH 3.0~6.0), 50 mM Tris-HCl buffer (triangles, pH 6.0~8.0), and 50 mM TAPS buffer (circles, pH 8.0~10.0). The values on the ordinate are shown as percentages of enzyme activity (100%) observed at pH 8.0.

Tris-HCl 완충용액의 pH 8.0에서 최고활성이 나타났다. 또한, 50 mM Tris-HCl 완충용액의 pH 7.0에서의 활성이 50 mM glycine-NaOH 완충용액의 pH 8.0에서의 활성보다 높은 것으로 나타났다. *T. maritima* 유래의 β -glucuronidase는 pH 5~7 [28], rhamnulose-1-phosphate aldolase는 pH 6.5 [27] 범위에서 최적활성을 보였다.

3.4. 재조합 xylose isomerase 처리 전후의 푸코이단과 사포닌의 암세포 생육저해 활성

재조합 xylose isomerase의 처리 여부에 따른 푸코이단 및 사포닌의 암세포 생육저해 활성을 암세포주를 이용하여 검토하였다.

사람 위암 세포주인 AGS (human gastric adenocarcinoma) 세포에 적용한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 푸코이단은 전반적으로 효소 무처리구가 효소 처리구에 비해 높은 생육저해

활성을 나타내었다 (Fig. 3A). 이러한 경향은 동일한 효소양에 비해 푸코이단의 양을 증가시켜도 유사하게 나타났다. 반면, 사포닌은 효소 처리구가 효소 무처리구에 비해 높은 생육저해 활성을 나타내었으며, 효소대비 사포닌 양이 증가할수록 생육저해 활성도 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 3B). 또한, 사포닌을 1 μ g/mL의 농도에서 효소로 처리했을 때부터 통계적으로 유의한 생육저해 활성을 보였다.

사람 대장암 세포주인 HT-29 세포에 적용한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 푸코이단은 전반적으로 통계적 유의성이 없는 낮은 생육저해 활성을 보였으며, 효소처리 유무에 따른 생육저해 활성의 차이도 보이지 않았다(Fig. 4A). 사포닌은 효소 무처리구도 상기의 위암 세포주와 유사한 생육저해 활성을 보였으며, 효소 처리구는 사포닌의 농도 의존적으로 높은 생육저해 활성을 보였다 (Fig. 4B). 위암 세포주와 달리 대장암 세포주에서는 사포닌의 0.5 μ g/mL의 농도에서부터 통계

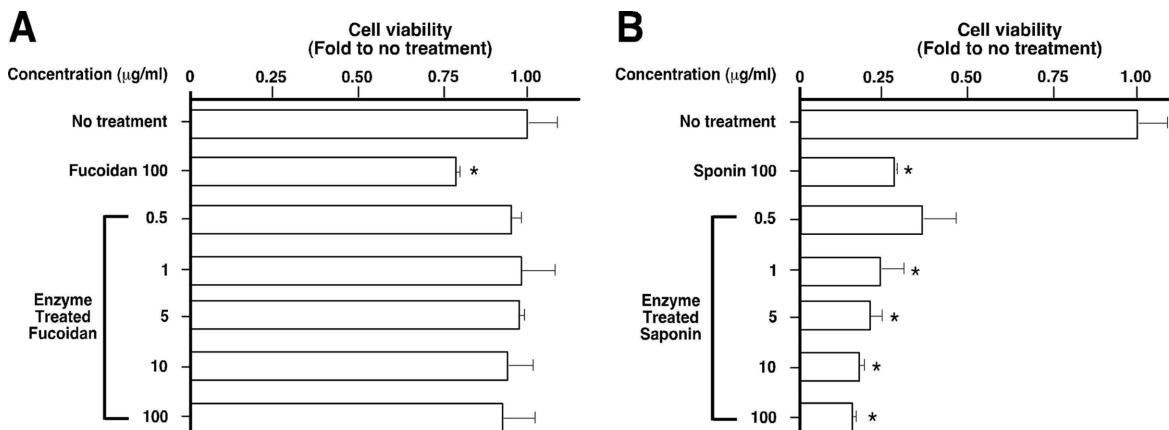


Fig. 3. Effect on cell viability of human gastric cancer (AGS) cells by the treatment of enzyme-treated (A) fucoidan and (B) saponin. Mean \pm SEM for three samples are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

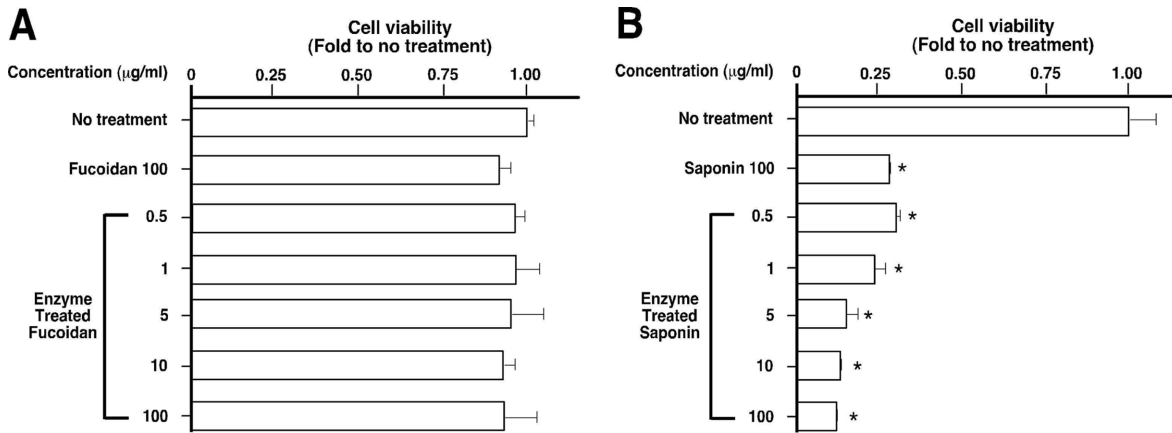


Fig. 4. Effect on cell viability of human colon cancer (HT-29) cells by the treatment of enzyme-treated (A) fucoidan and (B) saponin. Mean \pm SEM for three samples are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

적으로 유의한 생육저해 활성을 보였다.

안 등 [4]은 AGS 세포에 100 µg/mL 농도의 푸코이단을 처리하였을 때 60% 이상의 생육저해 활성을 나타낸다고 보고하였으나, 본 연구에서는 같은 조건에서 25% 정도의 생육저해 활성을 보였다. 현 등 [3]은 대장암 세포에 100 µg/mL 농도의 푸코이단을 처리하였을 때 62%의 생육저해 활성을 나타낸다고 보고하였지만, 본 연구에서는 항암활성이 관찰되지 않았다. 현 등 [3]은 실험에서 HCT-15 대장암 세포주를 사용하였고, 본 연구에서는 HT-29 대장암 세포주를 사용하여 실험조건에 차이가 있다. 또한, 본 연구에서 효소를 처리한 푸코이단의 암세포주에 대한 생육저해 활성이 낮은 것은 효소 처리에 의해 푸코이단 잔기의 변형이 오히려 생육저해 활성을 낮추었을 가능성도 있을 것이다. 푸코이단은 분자량이 20만 dalton (Da)을 넘는 고분자 물질이고, 인삼 사포닌은 각각 ginsenoside-Rg1 (C₄₂H₇₂O₁₄2H₂O)이 837 Da, ginsenoside-Rb1 (C₅₄H₉₂O₂₃3H₂O)이 1163 Da, ginsenoside-Rf (C₄₂H₇₂O₁₄2H₂O)이 837 Da의 분자량을 가진다. 효소가 두 기질에 대하여 일정하게 반응하였다면 전체 분자량에서 차지하는 효소로 변화된 잔기의 비율은 분자량이 작은 사포닌에서 높게 나타날 것이다. 전 등 [12]은 김치에서 분리한 β-glucosidase 활성균주인 *Lactobacillus brevis* LH8이 분비하는 효소를 이용하여 흡수율과 생리활성이 낮은 ginsenoside Rd를 흡수율과 생리활성이 높은 compound K로 전환시킨 결과를 보고하였다. 이 등 [9]은 발효를 통하여 인삼잎의 ginsenoside 함량이 최대 15배 증가한다는 결과를 보고하였다. 김 등 [11]은 인삼에 다양한 효소들을 처리하여 추출효율과 항산화 활성을 비교하였는데, pectinase 처리구가 가장 높은 추출효율과 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다. 이러한 보고들은 인삼에 함유된 사포닌 등의 유효성분이 효소처리에 의해 구조가 변화했다는 것을 의미하며 [9,11,12], xylose isomerase의 처리에 의해 사포닌의 암세포에 대한 생육저해 활성이 증진된 본 연구의 결과와 유사한 결과로 사료된다.

본 연구에서 재조합 발현한 xylose isomerase는 HFCS의 생

산 [20] 및 바이오에탄올 생산 [19] 분야에서 활용이 가능할 뿐만 아니라, 특히 암세포에 대한 사포닌의 생육저해 활성을 높일 수 있으므로 부가가치가 높은 식의약 소재의 개발에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

4. 요약

호열성 진정세균인 *Thermotoga maritima*의 xylose isomerase 유전자를 대장균을 이용하여 클로닝하고 재조합 발현시켰다. 재조합 효소의 최적활성은 90°C와 pH 8.0에서 관찰되었다. 사포닌을 재조합효소로 처리한 후 사람의 위암 세포주 (AGS)와 대장암 세포주 (HT-29)에 처리한 결과, 효소 무처리 사포닌에 비해 우수한 암세포 생육저해 활성을 나타냈다. 한편, 푸코이단을 재조합효소로 처리한 후 동일 세포주들에 처리한 결과, 효소 무처리 푸코이단과 비슷한 암세포 생육저해 활성을 보였다. 1 µg/mL 농도의 효소 처리 사포닌은 100 µg/mL 농도의 효소 무처리 사포닌과 유사하거나 우수한 암세포 생육저해 활성을 보였다. 본 연구결과는 기능성 식품이나 의약품의 개발에 참고가 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Schaeffer, D. J. and V. S. Krylov (2000) Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 208-227.
- Dobashi, K., T. Nishino, M. Fujihara, and T. Nagumo (1989) Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* 194: 315-320.
- Hyun, J. H., S. C. Kim, J. I. Kang, M. K. Kim, H. J. Boo, J. M. Kwon, Y. S. Koh, J. W. Hyun, D. B. Park, E. S. Yoo, and H. K. Kang (2009) Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15

- colon carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1760-1764.
4. An, I.-J., S.-D. Cho, J.-K. Kwon, H.-R. Kim, H.-J. Yu, and J.-Y. Jung (2012) The effects of fucoidan on the activation of macrophage and anticancer in gastric cancer cell. *J. Fd Hyg. Safety* 27: 406-414.
 5. Ko, E. J. and H. G. Joo (2009) Immunostimulatory effects of fucoidan on mouse splenocytes. *Lab. Anim. Res.* 25: 195-200.
 6. Zhou, W., M. Q. Feng, J. Y. Li, and P. Zhou (2006) Studies on the preparation, crystal structure and bioactivity of ginsenoside compound K. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 8: 519-527.
 7. Elma, Z. T., E. Z. Ilian, and J. H. Christina (1991) Effect of ginsenoside Rg1 on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytother. Res.* 5: 46-48.
 8. Kang, S. Y., S. H. Kim, V. B. Schini, and N. D. Kim (1995) Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen. Pharmacol.* 26: 483-487.
 9. Lee, K.-S., B.-J. Seong, G.-H. Kim, S.-I. Kim, S.-H. Han, H.-H. Kim, and N.-D. Baik (2010) Ginsenoside, phenolic acid composition and physiological significances of fermented ginseng leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1194-1200.
 10. Choung, M. G. and E.-H. Sohn. (2011) Anti-tumor activity of saponin fraction of *Platycodon grandiflorum* through immunomodulatory effects associated with NO production in RAW264.7 cells. *Kor. J. Plant Res.* 24: 557-563.
 11. Kim, Y.-C., C.-W. Cho, Y.-K. Rhee, K. M. Yoo, and J. Rho (2007) Antioxidant activity of ginseng extracts prepared by enzyme and heat treatment. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1482-1485.
 12. Quan, L.-H., Z. Liang, H.-B. Kim, S.-H. Kim, S.-Y. Kim, Y.-D. Noh, and D.-C. Yang (2008) Conversion of ginsenoside Rd to compound K by crude enzymes extracted from *Lactobacillus brevis* LH8. *J. Ginseng Res.* 32: 226-231.
 13. Bioproject, *Thermotoga maritima* MSB8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/111> (2003).
 14. Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker (2013) Biology of microorganisms. 10th ed., p. 441. Prentice Hall. London, UK.
 15. Lozada-Ramrez, J. D., A. Sanchez-Ferrer, and F. Garca-Carmona (2013) Recombinant S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Thermotoga maritima*: cloning, overexpression, characterization, and thermal purification studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170: 639-653.
 16. Lee, H. H. and S. T. Jung (2013) Overexpression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of β -N-acetylglucosaminidase from *Thermotoga maritima* encoded by the Tm0809 gene. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst Commun.* 1: 115-117.
 17. Ma, Y. H., D. Q. Lv, S. Zhou, D. Y. Lai, and Z. M. Chen (2013) Characterization of an aldo-keto reductase from *Thermotoga maritima* with high thermostability and a broad substrate spectrum. *Biotechnol. Lett.* 35: 757-762.
 18. Jokela, J., O. Pastinen, and M. Leisola (2002) Isomerization of pentose and hexose sugars by an enzyme reactor packed with cross-linked xylose isomerase crystals. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 67-76.
 19. Chandrakant, P. and V. S. Bisaria (2000) Application of a compatible xylose isomerase in simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 32-39.
 20. Bucke, C. (1983) Glucose transforming enzymes. pp. 93-127. In: W. Fogarty (ed.). *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers, London, UK.
 21. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., pp. 23-38. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
 22. Vieille, C., J. Hess, P. K. Kelly, and J. G. Zeikus (1995) XylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1867-1875.
 23. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 24. Walfridsson, M., X. Bao, M. Anderlund, G. Lilius, L. Bulow, and B. Hahn-Hagerdal (1996) Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4648-4651.
 25. Michael, C. A., A. S. Dominic, and M. Anue (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589-595.
 26. Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter, and C. M. Fraser (1999) Genome sequence of *Thermotoga maritima*: evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria. *Nature* 399: 323-329.
 27. Babich, L., A. F. Hartog, L. J. van Hemert, F. P. Rutjes, and R. Wever (2012) Synthesis of carbohydrates in a continuous flow reactor by immobilized phosphatase and aldolase. *ChemSusChem* 5: 2348-2353.
 28. Xu, J., Y. S. Tian, R. H. Peng, B. Zhu, J. J. Gao, and Q. H. Yao (2012) Characterization of a thermostable β -glucuronidase from *Thermotoga maritima* expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:1211-1219.
 29. Rodrigues, M. V., N. Borges, C. P. Almeida, P. Lamosa, and H. Santos (2009) A unique beta-1,2-mannosyltransferase of *Thermotoga maritima* that uses di-myoinositol phosphate as the mannosyl acceptor. *J. Bacteriol.* 191: 6105-6115.