

Evaluation of *in-vitro* Anti-thrombosis and Anti-oxidation Activity of Lees of Takju (Wookukseng)

Mi-Sun Kim¹, Ye-Seul Lee¹, Jong Sik Kim², Woo-Chang Shin³ and Ho-Yong Sohn^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

²Department of Life Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

³Research Institute, Kooksoondang Brewery Co. LTD. Seongnam 460-120, Korea

Received January 20, 2015 / Revised March 25, 2015 / Accepted April 13, 2015

This study was performed to develop high-value-added biomaterials for health and beauty products. Extracts of ethanol and hot water and their subsequent organic solvent fractions were prepared from Lees of Wookukseng (LW), a commercialized Korean traditional rice wine. We investigated their activities on blood coagulation, platelet aggregation, hemolysis against human red blood cells (hRBCs), and anti-oxidation. The water content, pH and brix of the LW were 80.3%, 3.94 and 13.0°, respectively. The yield of ethanol extraction (6.62%) was 3.15 times higher than that of hot-water extraction (2.1%), and the ethylacetate fraction (EAF) of ethanol extract showed the highest content of total polyphenol (128 mg/g) among the various fractions. In anticoagulation activity assay, the EAF of ethanol extract showed a 15-fold extension in TT, PT, and aPTT, indicating that the EAFs contain various inhibitory substances against thrombin, prothrombin and coagulation factors. In anti-platelet aggregation activity assay, the butanol fraction and water residue of ethanol extract showed significant inhibition activity. The activities were comparable to aspirin, a commercial anti-thrombosis agent. The above extracts and fractions did not show hemolysis activity against hRBC up to 5 mg/ml, and had radical scavenging activity against DPPH anion, ABTS cation and nitrite. Our results suggest that the active fractions prepared from LW, which has no specific usage until now, have a high potential as novel resources for anti-thrombosis agents.

Key words : Anticoagulation, anti-platelet aggregation, hemolysis, lees of Wookukseng, Takju

서 론

술은 인류가 만든 최초의 발효음료이며, 각각의 나라는 민족의 공감성과 문화성이 깃든 고유의 술을 가지고 있다. 그 예로서, 프랑스의 와인, 러시아의 보드카, 네덜란드 진, 일본의 사케 등이 있으며, 우리나라에는 고유의 전통주로 막걸리가 있다[4, 18]. 실제 술은 집단의 통합에 사용되어 왔으며, 과거에는 신과 인간과의 교감을 위한 제례용으로 한정되어 사용되어 왔으나, 최근에는 인간과 인간과의 교감용으로, 생활주류용으로 사용되면서 수요가 지속적으로 증가되고 있는 실정이다 [19].

막걸리는 우리나라 고유의 탁주의 한 종류로서, 곡물에 누룩을 첨가하여 발효하고 이후 여과하지 않은 상태로 발효에 관여한 효모나 유산균 등 발효산물 전체를 음용하는 세계유일

의 술로서, 상대적으로 낮은 알코올 함량으로 건강에 부담이 없으며, 단백질, 식이섬유 등이 풍부하고, 다양한 유기산과 비타민 및 미량 유용 생리활성 물질을 포함하는 있어 최근 새롭게 각광받고 있다[18, 19]. 한편 주박은 술을 제조한 후, 술을 걸러내는 과정에서 만들어지는 부산물로, 술지게미, 재강 또는 아래기 등으로 불리며, 주박 역시 상당량의 영양성분과 유용 생리활성 성분을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며[9], 실제 쌀을 주원료로 하는 탁주 주박은 식량이 부족하던 시기에 구황식품으로 이용되기도 하였다[18]. 최근 전통주에 대한 사회적 관심과 수요 증가로 탁주 및 약주 제조가 증대되면서, 이의 제조 부산물인 주박 생성 역시 급속도로 증가되고 있으나, 현재 대부분의 주박은 별도의 용도를 찾지 못하여 농업용 퇴비 또는 가축 사료로 이용되거나 폐기하고 있는 실정이다 [17].

현재까지 보고된 주박 관련 연구로는 주박의 향미 성분을 이용한 장아찌 제조[5], 주박을 첨가한 설기떡[3] 및 국수 제조[12] 등 다양한 식품 제조시 첨가물로서의 가능성 연구가 진행되어 왔으며, 또한 주박의 잔당 및 알코올을 이용하여 발효배지로 이용하고자 하는 연구[22] 및 환경정화용 유해물질 흡착제로의 이용 연구[1]가 보고되어 있다. 한편 주박의 유용생리 활성에 대한 연구로는 대장암 세포 생육억제[7, 25] 및 항균활

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-7804

E-mail : hysohn@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성[10, 13], 항혈전[9] 및 항산화 효과[13, 31], 항염증[23] 및 알리지 억제 효과[8], 고혈압[14, 15] 및 혈당 강하효과[16], 항당뇨[11, 19, 20] 및 비만 억제 효과[30] 등이 알려져 있으며, 최근에는 주박의 보습[29], 미백 및 주름개선 효과[4, 20, 21, 32] 등이 보고되면서 화장품 향장소재로의 이용 가능성에 대한 연구[24, 28]가 활발히 진행되고 있다.

본 연구팀에서는 주박을 이용한 고부가가치 향장소재 개발을 목표로 다양한 주박의 유용생리활성을 보고한 바 있으며[9, 10, 18-21, 23], 최근 5종의 턱주 및 약주 주박 추출물의 항혈전 활성을 평가한 결과, 우국생 주박의 열수 및 ethanol 추출물에서 유의적인 트롬빈 저해활성을 확인하였으며, 특히 혈소판 응집저해 활성 평가에서는 대조구로 사용된 aspirin에 필적하는 강력한 활성이 나타나, 우국생 주박 추출물이 항혈전제로 이용 가능함을 제시한 바 있다[9]. 이에 본 연구에서는 우국생 주박의 ethanol 및 열수 추출물로부터 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 혈액응고 저해활성, 혈소판 응집저해 활성, 인간 적혈구 용혈활성 및 항산화 활성을 평가한 결과 강력한 항혈전 활성분획을 확인하였으며, 우국생 주박 추출물의 활성 분획을 이용한 항혈전제 개발 가능성을 확인하기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 우국생 주박은 2013년 (주)국순당의 상업적 시설에서 생산된 주박을 공급받아 사용하였으며, 주박의 열수 추출물 제조를 위해서는 주박 시료 무게에 대해 10배의 증류수를 가한 후 100°C에서 30분간 3회 반복 추출하였으며, 이후 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 분말로 조제하였다. 유기용매 분획물 제조의 경우, 추출물을 물에 혼탁한 후 *n*-hexane, ethylacetate 및 butanol을 이용하여 순차적으로 분획하고 최종적으로 물 잔류물을 회수하였으며, 각각의 분획물들은 상기와 동일한 방법으로 감압건조하여 분말화 하였다[10]. 한편 ethanol 추출물 제조를 위해서는 주박 시료 무게에 대해 10배의 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 가한 후 상온에서 24시간, 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 상기와 동일한 방법으로 감압건조하여 분말로 조제하였다. 이후 유기용매 분획물도 상기와 동일한 방법으로 조제하였다. 주박의 다양한 추출물 및 분획물의 분말시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, *in-vitro* 항혈전 활성, 적혈구 용혈활성 및 항산화 활성 평가에 사용하였다. 항혈전 활성평가에 사용한 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)를 사용하였으며, PT reagent와 aPTT reagent는 MD Pacific Hemostasis (MD

Pacific Technology Co., Ltd, Huayuan Industrial Area, China)의 분석시약을 사용하여 측정하였다[9, 10]. 기타 사용한 시약은 시약급 이상으로 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 주박 시료는 안동대학교 식품영양학과에서 보관하고 있다(voucher specimen 2013-KSD-W2-1~5, KSD-E2- 1~5).

항응고 활성

항혈전 활성 중 혈액응고저해 활성은 시료의 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하여 평가하였다[10]. 혈액 응고에서 중추적 역할을 수행하는 thrombin [2]의 활성을 평가하는 TT는 37°C에서 0.5 U thrombin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 50 μl와 20 mM CaCl₂ 50 μl, 다양한 농도의 시료 10 μl를 Amelung coagulometer KC-1A (Amelung, Lemgo, Germany)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100 μl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, thrombin저해 활성은 3회 이상 반복한 시료 TT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 TT 평균치의 비로 나타내었다[9]. 한편 외인성 응고제(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 PT는 혈장 70 μl와 다양한 농도의 시료 10 μl를 coagulometer 의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 μl의 PT reagent를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, prothrombin 저해 활성은 3회 이상 반복한 시료 PT 실험의 평균치를 DMSO의 PT 평균치의 비로 나타내었다[10]. 내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정의 경우에는, 표준혈장 70 μl와 다양한 농도의 시료 10 μl를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 μl의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65 μl CaCl₂ (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, aPTT 연장 활성은 3회 이상 반복한 시료 aPTT 실험의 평균치를 DMSO의 aPTT 평균치의 비로 나타내었다[10]. 이때 시료 대조군으로는 aspirin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

혈소판 응집 저해 활성

항혈전 활성 중 혈소판 응집저해 활성은, 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하는 impedance 법[27]을 사용하였으며, 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)은 적십자로부터 공급받아 사용하였다. PRP의 전처리 및 수세과정은 기존의 보고[9, 10]와 동일하게 하였으며, 혈소판 응집은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 사용해 37°C에서 측정하였다. 먼저 10 mM CaCl₂ 50 μl, suspending buffer 147.5 μl, 시료

5 μl 가 포함된 반응 cuvette에 50 μl 의 혈소판(5×10^8 cells/ml)을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 μl 를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under 를 측정하여 평가하였다[27]. 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집정도를 나타내며, slope 는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 나타내며, area under 는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다[27]. 시료의 혈소판 응집 저해 활성을 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under값의 비를 백분율로 나타내었다[9, 10].

인간 적혈구 용혈 활성 평가

우국생 주박 추출물 및 분획물의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100 μl 를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100 μl 를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100 μl 를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다[9]. 시료의 용매 대조구로는 DMSO (2%)를 사용하였으며, 적혈구 용혈을 위한 실험 대조구로는 triton X-100 (1.0 mg/ml) 및 amphotericin B (0.02 mg/ml)를 사용하였다. 용혈 활성을 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$(\%) \text{ Hemolysis} = [(A\text{bs. S} - A\text{bs. C}) / (A\text{bs. T} - A\text{bs. C})] \times 100.$$

Abs. S: 시료 첨가구의 흡광도, Abs. C: DMSO 첨가구의 흡광도, Abs. T: triton X-100 첨가구의 흡광도.

항산화 활성

우국생 주박 시료의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) anion scavenging activity [DSA], ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] cation scavenging activity [ASA] 및 nitrite scavenging activity [NSA] 측정으로 평가하였으며, 활성평가의 대조구로는 vitamin C (Sigma Co.)를, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다[6]. 먼저 DSA 측정의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20 μl 에 99.5% ethanol 에 용해시킨 2×10^{-4} M DPPH용액 380 μl 를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516 nm에서 microplate reader (Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. DSA는 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 백분율로 표시하였다[6]. ASA 측정의 경우, 7 mM ABTS (Sigma Co.) 5 ml와 140 mM potassium persulfate 88 ml를 섞은 후 상온에서 16시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰으며, 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도

값이 1.5가 되도록 ethanol로 희석하였다. 조제된 희석용액 190 μl 와 시료 10 μl 를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 ASA (%)를 결정하였다[6].

$$\text{ASA (\%)} = [(C\text{-S})/C] \times 100, C: \text{DMSO 첨가시 흡광도}, S: \text{시료 첨가시 흡광도}.$$

NSA측정의 경우, 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가지고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정한 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 Griess reagent (Sigma Co.)를 가하고 혼합하였다. 이후 15분간 실온에서 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 nitrite 양을 측정하였다. NSA (%)는 다음의 식에 의해 계산하였다[6].

$$\text{NSA (\%)} = [1-(A\text{-C})/B] \times 100,$$

A: 1 mM nitrite 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도,

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도, C: 시료의 흡광도.

기타 분석

총플라보노이드(Total flavonoid) 함량 측정은 기존의 보고된 방법[26]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 methanol교반 추출하고 여과한 추출액 400 μl 에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 μl 를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. 총폴리페놀(Total polyphenol) 함량은 시료 400 μl 에 50 μl 의 Folin-ciocalteau, 100 μl 의 Na_2CO_3 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[26]. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[29]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

실험 결과는 SPSS 21.0 버전을 사용하여 mean \pm SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

결과 및 고찰

우국생 주박 추출물, 분획물의 제조 및 이화학적 특성

우국생은 쌀과 누룩으로 1단 담금 및 2단 담금을 통해 제조되며, 최종 발효 술덧을 60~80 매쉬의 체별기를 통해 걸러낸다. 이때 걸러진 주박의 수분함량은 80.3%, pH 3.94, brix 13.0 및 알코올 함량은 약 1.8%를 나타내었다. 먼저 ethanol 추출의 경우 추출효율은 6.62%로 열수 추출의 2.1%보다 3.15배 높은

수율을 나타내었으며(Table 1, 2), ethanol 추출물의 경우 n-hexane 분획물이 추출물의 9.4%를 차지하여 지용성 성분 함량이 매우 높은 반면, 열수 추출물의 경우 n-hexane 분획물은 0.1% 이하를 나타내었다. 주박ethanol 추출물의 경우 ethylacetate 분획, butanol 분획 및 물 잔류물의 분획효율은 각각 2.4%, 20.4%, 67.8%를 나타낸 반면, 열수 추출물의 경우 4.0%, 11.1%, 84.8%를 나타내어, 열수 추출물은 ethylacetate 분획물 및 물 잔류물 함량이 ethanol 추출물에 비해 높음을 알 수 있었다. 주박 ethanol 추출물 및 이의 분획물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석 결과, 폴리페놀 함량은 ethylacetate 분획(128 mg/g) 및 butanol 분획(6.2 mg/g)에서 높게 나타났으며, 플라보노이드 함량은 ethanol 추출물 및 물 잔류물에서 0.7~1.0 mg/g으로 상대적으로 높게 나타났다(Table 1). 또한 총당 및 환원당 함량은 대부분이 butanol 분획 및 물 잔류물에서 425~520 mg/g 및 322~502 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다. 그러나 열수 추출물 및 이의 분획물의 경우, 폴리페놀 함량은 ethylacetate 분획 및 butanol 분획에서 높게 나타났으나 그 함량은 43.8~46.9 mg/g으로 ethanol 추출물보다는 낮게 나타났으며, 총플라보노이드 함량은 n-hexane 분획에서 1.8 mg/g으로 가장 높게 나타났다(Table 2). 총당 및 환원당의 경우 추출물의 대부분을 차지하는 물 잔류물에서 높게 나타났다. 이러한 결과는 주박의 ethanol 및 열수 추출물과 이들의 분획물이 각각 다른 다양한 성분들을 함유하고 있음을 제시하고 있으며, ethylacetate 분획의 유용 생리활성 가능성을 제시한다.

우국생 주박 시료의 혈액응고 저해활성

우국생 주박의 항혈전 활성 평가를 위해 혈액응고 저해활성

을 평가하였다. 먼저 대조구로 사용된 항혈전제 aspirin (1.5 mg/ml)은 무처리구에 비해 TT는 1.6배, PT는 1.7배, aPTT는 1.4배 연장시켜 우수한 혈액응고 저해활성을 나타내었다 (Table 3). 우국생 주박의 ethanol 추출물의 경우 미약한 저해활성을 나타내었으나, butanol 분획과 ethylacetate 분획에서 유의적인 thrombin 저해 및 prothrombin 저해활성이 나타났으며, 특히 ethylacetate 분획의 경우 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT 모두에서 15배 이상의 연장된 응고시간을 나타내어 매우 강력한 thrombin, prothrombin 및 coagulation factor 저해활성을 나타내었다(Table 3). 이러한 강력한 저해는 2.5 mg/ml 농도에서도 나타나 TT는 3.1배, PT 및 aPTT는 15배 이상 연장시켜 주박의 ethylacetate 분획물이 강력한 혈전 생성억제물질을 포함함을 알 수 있었다. 한편 유의적인 트롬빈 저해활성이 확인된 우국생 주박의 열수 추출물[9]의 경우 butanol 분획 및 ethylacetate 분획에서 유의적인 TT, PT, aPTT 연장활성이 나타났으나, 트롬빈 저해활성이 가장 우수한 butanol 분획의 경우 5 mg/ml 농도에서 1.7배의 연장효과, coagulation factor 저해활성이 가장 우수한 ethylacetate 분획의 경우 5 mg/ml 농도에서 1.7배의 연장효과를 나타내어, ethanol 추출물 시료보다 미약한 혈액응고 저해활성을 나타내었다 (Table 3). 따라서 혈액응고 저해제 개발을 위해서는 우국생 주박의 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획물을 대상으로 활성물질의 정제 및 특성분석이 필요하다고 판단된다.

우국생 주박 시료의 혈소판 응집저해 활성 및 적혈구 용혈 활성

혈전 생성반응의 개시 및 강화에 필수적인 혈소판은 colla-

Table 1. Yields of ethanol extract and its solvent fractions of lees of wookuseng and their component assay

Samples	Extraction or fraction yield (%)	Component (mg/g-extract)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
Ethanol ex. ¹	6.62	1.0±0.1	35.0±1.1	394.1±17.0	367.8±15.0
Hexane fr. ²	9.4	0.3±0.1	1.4±0.1	77.2±1.3	1.6±0.2
Ethylacetate fr.	2.4	0.3±0.0	128.1±2.0	96.3±3.5	22.8±1.9
Butanol fr.	20.4	0.2±0.0	56.2±3.6	425.8±14.1	322.3±13.8
Water residue	67.8	0.7±0.1	26.5±1.3	520.2±17.4	502.2±16.4

¹ex : extract, ²fr : fraction

Table 2. Yields of hot water extract and its solvent fractions of lees of wookuseng and their component assay

Samples	Extraction or fraction yield (%)	Component (mg/g-extract)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
Hot-water ex. ¹	2.10	0.7±0.0	34.5±1.1	312.3±23.4	222.4±0.8
Hexane fr. ²	0.1	1.8±0.1	4.0±0.0	65.0±1.2	3.9±0.2
Ethylacetate fr.	4.0	0.9±0.1	46.9±2.2	193.2±3.6	87.1±1.9
Butanol fr.	11.1	0.9±0.1	43.8±0.9	232.3±5.4	220.4±9.1
Water residue	84.8	1.3±0.1	21.0±0.1	3 23.9±18.5	199.9±5.6

¹ex : extract, ²fr : fraction

Table 3. Effect of the different extracts and their solvent fractions prepared from lees of wookukseng on blood clotting

Samples	Conc. (mg/ml)	Anti-coagulation activity (\times control)					
		Ethanol extract			Hot water extract		
		TT	PT	aPTT	TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a
Aspirin	1.5	1.6±0.1 ^c	1.7±0.0 ^c	1.4±0.1 ^b	1.6±0.1 ^c	1.7±0.0 ^d	1.4±0.1 ^b
Ethanol or hot water ex. ¹	5.0	1.1±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.4±0.0 ^b	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a
Hexane fr. ²	5.0	1.0±0.1 ^a	1.1±0.0 ^a	1.1±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a
Ethylacetate fr.	5.0	>15.0 ^d	>15.0 ^d	>15.0 ^c	1.4±0.0 ^b	1.3±0.1 ^c	1.7±0.2 ^c
	2.5	3.1±0.1	>15.0	>15.0	1.1±0.1 ^a	1.1±0.0 ^a	1.2±0.1 ^a
Butanol fr.	5.0	1.3±0.0 ^b	1.3±0.0 ^b	1.0±0.0 ^a	1.7±0.2 ^c	1.2±0.0 ^b	1.4±0.1 ^b
Water residue	5.0	1.1±0.0 ^a	1.1±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a

Data are presented as relative clotting time based on solvent control (x control). The thrombin time (TT), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) of solvent control (dimethylsulfoxide) were 24.0 sec, 18.6 sec and 40.5 sec, respectively. Different letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

¹ex : extract, ²fr : fraction

gen, 혈구세포 등과 결합하여 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성한다[28]. 따라서 aspirin과 같은 효과적인 혈소판 응집저해제는 항혈전제로 사용되고 있다. 우국생 주박시료의 혈소판 응집능을 평가하기 위해, 먼저 용매 대조구로 사용된 DMSO의 혈소판 응집능을 평가한 결과 area under 118.8을 나타내었으며, 상업적으로 이용되고 있는 혈소판 응집저해제인 aspirin (0.25 mg/ml)은 area under 68.9를 나타내어 용매 대조구(DMSO)의 58.4% 혈소판 응집능을 나타내어 우수한 혈소판 응집저해활성을 나타내었으며, 농도의존적인 응집저해를 나타내었다(Table 4). 주박 ethanol 추출물(0.25 mg/ml)의 경우 amplitude 15Ω, area under 92.0을 나타내어 DMSO의 78% 혈소판 응집능을 나타내어 aspirin보다는 미약하지만 혈소판 응집저해를 나타내었으며, butanol 분획 및 물 잔류물에서는 58.5~59.8의 area under 값을 나타내어 동일 농도의 aspirin에 펼쳐하는 응집저해를 나타내었다. 또한 주박의 열수 추출물에서도 amplitude 12Ω, area under 83.1을

나타내어 DMSO의 70.4% 혈소판 응집능을 나타내었으며, ethylacetate 분획 및 butanol 분획에서는 DMSO에 비해 58.1~ 60.8%의 혈소판 응집이 나타났다. 특이한 것은, 각 추출물의 n-hexane 분획에서 매우 강력한 혈소판 응집 촉진활성이 나타난 바, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 상기의 결과는 우국생 주박 ethanol추출물의 butanol 분획 및 물 잔류물이 혈소판 응집저해 활성이 우수하며, 향후 우국생 주박으로부터 혈소판 응집저해 개발이 가능함을 제시하고 있다. 한편 인간 적혈구를 이용한 우국생 주박시료의 용혈활성을 평가한 결과, 다양한 추출물 및 분획물은 0.5 mg/ml 농도까지 3.5% 이하의 용혈활성을 나타내어 적혈구 용혈에 따른 급성독성은 나타나지 않으리라 판단되었다 (Table 5).

우국생 주박 시료의 항산화 활성

항산화 활성은 혈전 생성을 포함한 다양한 생명현상 유지에

Table 4. Effect of the different extracts and their solvent fractions prepared from lees of wookukseng on platelet aggregation activity

Chemicals/Samples (mg/ml)	Ethanol extract					Hot water extract				
	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under	PAA ¹ (%)	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under	PAA (%)
DMSO	18	2	30	118.0	100.0	18	2	30	118.0	100.0
Aspirin (0.25)	11	1	38	68.9	58.4	11	1	38	68.9	58.4
Aspirin (0.50)	7	1	58	45.7	38.7	7	1	58	45.7	38.7
Extract (0.25)	15	2	45	92.0	78.0	12	2	38	83.1	70.4
Hexane fr. ² (0.25)	25	10	2	266.5	225.8	27	6	5	251.8	213.4
EtAc fr. ³ (0.25)	15	2	30	102.7	87.0	11	1	40	71.7	60.8
Butanol fr. (0.25)	8	2	38	59.8	50.8	9	2	31	68.6	58.1
Water residue (0.25)	8	1	40	58.5	49.6	21	3	26	140.8	119.3

¹PAA : Platelet Aggregation Activity. Data are presented as representative result relative of independent three determinations. Amplitude is expressed as ohms by maximum extent of platelet aggregation, and slope (rate of reaction) is determined by drawing a tangent through the steepest part of curve. Area under is a calculated area in descent drawing during platelet aggregation.

²fr : fraction, ³EtAc fr. : Ethylacetate fraction. The concentrations of samples used were 0.25 mg/ml, respectively

Table 5. Hemolytic activity of the different extracts and their solvent fractions prepared from lees of wookukseng against human red blood cell (hRBC)

Chemicals (mg/ml)	Hemolysis against hRBC (%)
DMSO	0
Triton-X 100 (1.0).	100±1.4
Amphotericin B (0.02)	99.4±2.1
Samples (0.5 mg/ml)	Hemolysis against hRBC (%)
	Ethanol extract Hot water extract
Extract	-2.5±0.7 1.9±1.6
Hexane fr. ¹	-0.9±1.4 0.2±2.1
Ethylacetate fr.	3.5±1.8 3.0±1.8
Butanol fr.	-0.6±0.2 -1.7±0.6
Water residue	0.6±1.2 3.3±1.5

Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Hemolytic activity was evaluated using 4% human red blood cell and the relative hemolysis (%) was calculated by following equation. (%) Hemolysis = [(Abs. S - Abs. C)/(Abs. T - Abs. C)] ×100 (For Abs. S, Abs. C and Abs.T, refer the materials and methods). ¹fr : fraction

필수적이므로[6, 31], 우국생 주박의 다양한 추출물과 분획물의 항산화 활성을 비교하였다. 먼저 대조구로 사용된 vitamin C는 0.006 mg/ml농도에서 각각 31.1%, 75.7% 및 28.7%의

DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 nitrite 소거능을 나타내었으며, 농도의존적인 소거능 활성 증가를 나타냄을 확인하였다. 우국생 주박 시료의 경우 ethanol 추출물이 열수 추출물보다 우수한 소거능을 나타내었으나, 0.5 mg/ml농도에서 9.4%, 23.3%, 31.6%의 DPPH 음이온 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 nitrite 소거능을 나타내어 vitamin C보다는 미약한 활성을 나타내었다. 또한 우국생 주박의 항산화 활성은 Kim 등이 보고[13]한 *Aspergillus kawachii*를 종균으로 자가제조한 쌀코지, 밀코지, 보리코지 및 상황버섯 코지를 이용한 현미탁주 주박의 DPPH 음이온 소거능보다는 약한 소거능을 나타내었으며, Kwon 등이 보고[14]한 자가제조 코지를 이용한 현미탁주의 주박의 nitrite 소거능보다는 약한 소거능을 나타내었다. 그러나, 이러한 차이는 상기 주박들과 우국생 주박의 발효 사용 균주, 발효기질, 분석시료 사용농도의 차이 등 다양한 요인이 관련되어 있어 정량적인 비교는 될 수 없으나, 상업적 시설에서 대량 생산된 우국생 주박의 항산화능을 알 수 있었다.

한편 분획물 시료에서는 ethylacetate 및 butanol 분획에서 상대적으로 우수한 소거능을 나타내었으며, 전체적으로 활성 음이온 보다는 활성 양이온에 대한 소거능이 더욱 우수하였다 (Fig. 1). 상기 결과는, 우국생 주박이 수용성, 지용성의 다양한 내열성 항산화 물질을 포함하고 있음을 의미하고 있다. 본 연

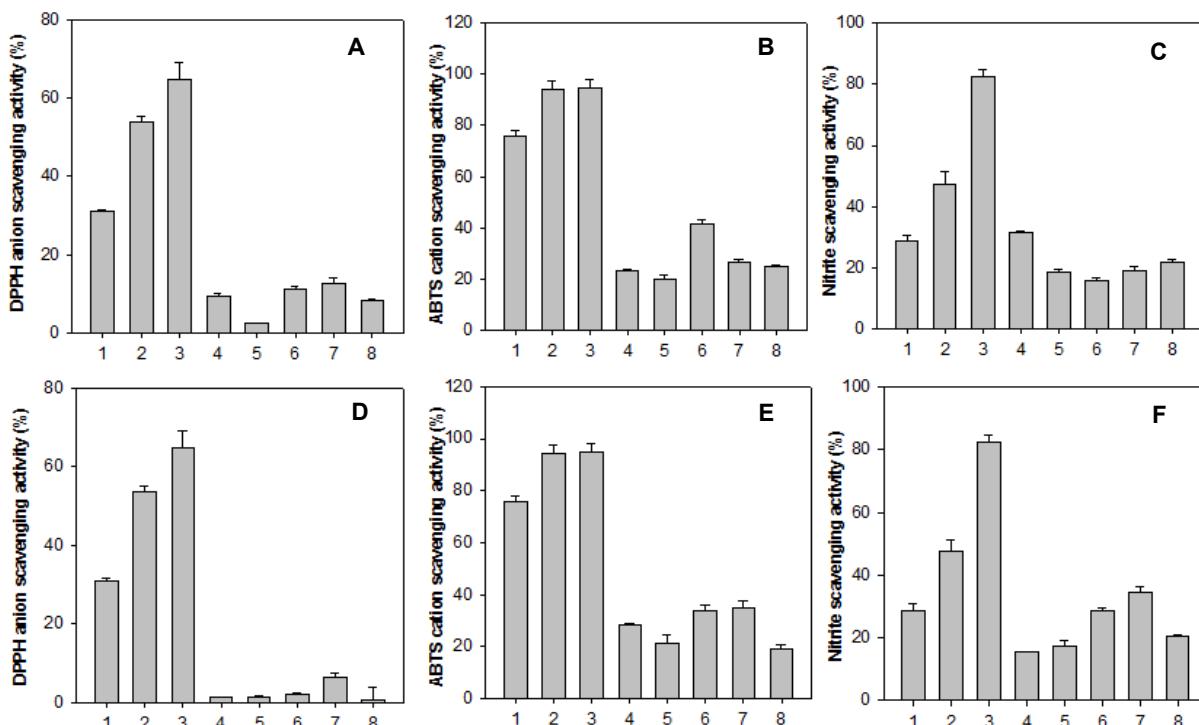


Fig. 1. Radical scavenging activity of the different extracts and their solvent fractions prepared from lees of wookukseng. The (A), (B), (C) and (D), (E), (F) indicate antioxidative activity of the ethanol extract and hot water extract of lees of wookukseng, respectively. Symbols; 1: vitamin C (0.006 mg/ml), 2: vitamin C (0.0125 mg/ml), 3: vitamin C (0.025 mg/ml), 4: ethanol or hot water extract (0.5 mg/ml), 5: hexane fraction (0.5 mg/ml), 6: ethylacetate fraction (0.5 mg/ml), 7: butanol fraction (0.5 mg/ml), and 8: water residue (0.5 mg/ml), respectively.

구결과는 우국생 주박 추출물의 분획물들을 이용한 항혈전 및 혈행개선 제품개발이 가능함을 제시하며, 특히 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획 및 물 잔류물을 이용한 혈액응고 저해 및 혈소판 응집저해제 개발이 가능함을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농림수산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호 112073-3)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Adachi, A., Hamamoto, H. and Okano, T. 2005. Use of lees materials as an adsorbent for removal of organochlorine compounds or benzene from wastewater. *Chemosphere* **58**, 817-822.
- Chen, H., Qi, X., He, C., Yin, Z., Fan, D. and Han, G. 2013. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thrombosis Res.* **131**, 173-177.
- Cho, Y. H., Cho, J. S., Kim, J. Y., Kim, U. S., Choi, J. H. and Park, J. H. 2013. Quality characteristics of sulgidduk with makgeolli lees. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **23**, 227-233.
- Jeon, H. J., Noda, M., Murayama, M., Matoba, Y., Kumagai, T. and Sugiyama, M. 2006. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9827-9833.
- Jung, H. N., Kim, H. O., Shim, H. H., Jung, H. S. and Choi, O. J. 2012. Quality characteristics of low-salt yacon jangachi using rice wine lees during storage. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 383-389.
- Jung, I. C. and Sohn, H. Y. 2014. Antioxidation, antimicrobial and antithrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 285-292.
- Kang, H. T., Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2014. Anti-proliferative activities of solvent fractions of lees extract in human colorectal HCT116 cells. *J. Life Sci.* **24**, 967-972.
- Kang, Y. J., Park, S. J., Bae, K., Yoo, J. M., Pyo, H. B., Choi, J. H. and Kim, T. J. 2011. Ethyl acetate extract of Korean rice wine lees inhibits IgE-Mediated degranulation in rat basophile leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis in mice. *J. Life Sci.* **21**, 1364-1369.
- Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2014. Evaluation of in-vitro antithrombosis activity of lees of Korean traditional wine. *J. Life Sci.* **24**, 865-872.
- Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2014. Anti-microbial and anti-thrombosis activities of lees of sweet potato soju. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 258-266.
- Kim, S. M. and Cho, W. K. 2006. Effect of takju (Korean turbid rice wine) lees on the serum glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Food Culture* **21**, 638-643.
- Kim, S. M., Yoon, C. H. and Cho, W. K. 2007. Quality characteristics of noodle added with Takju (Korean turbid rice wine) lees. *Kor. J. Food Culture* **22**, 359-364.
- Kim, T. Y., Jeon, T. W., Yeo, S. H., Kim, S. B., Kim, J. S. and Kwak, J. S. 2010. Antimicrobial, antioxidant and SOD-like activity effect of jubak extracts. *Kor. J. Food Nutr.* **23**, 299-305.
- Kwon, S. C., Jeon, T. W., Park, J. S., Kwak, J. S. and Kim, T. Y. 2012. Inhibitory effect on tyrosinase, ACE, and xanthine oxidase and nitrite scavenging activities of Jubak (alcohol filter cake) extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1191-1196.
- Lee, H. S., Hong, K. H., Kim, J. Y., Kim, D. H., Yoon, C. H. and Kim, S. M. 2009. Blood pressure lowering effect of Korean turbid rice wine (Takju) lees extracts in spontaneously hypertensive rat (SHR). *Kor. J. Food Culture* **24**, 338-343.
- Lee, H. S., Hong, K. H., Yoon, C. H., Kim, J. M. and Kim, S. M. 2009. Effect of Korean turbid rice wine (Takju) lees extract on blood glucose in the db/db mouse. *Kor. J. Food Culture* **24**, 219-223.
- Lee, J. H., Park, S. M., Park, C. D., Jung, H. J., Kim, H. S. and Yu, T. S. 2007. Characteristics of ju-bak and effect of ju-bak fertilizer on growth of crop plants. *J. Life Sci.* **17**, 1562-1570.
- Lee, S. J. and Shin, W. C. 2011. Physiological functionalities of makgeolli (Korean paradox). *Food Sci. Ind.* **44**, 2-11.
- Lee, S. J., Kim, J. H., Jung, Y. W., Park, S. Y., Shin, W. C., Park, C. S., Hong, S. Y. and Kim, G. W. 2011. Composition of organic acids and physiological physiological functionality of commercial makgeolli. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **43**, 206-212.
- Lee, S. J., Kwon, Y. Y., Cho, S. W., Kwon, H. S. and Shin, W. C. 2013. Effect of ehwa makgeolli containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 550-555.
- Lee, S. M., Lee, S. J., Kwon, Y. Y., Baek, S. H., Kim, J. S., Sohn, H. Y. and Shin, W. C. 2014. Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **43**, 1695-1700.
- Lim, Y. S., Bae, S. M. and Kim, K. 2004. Production of yeast spores from rice wine cake. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 184-189.
- Park, M. J., Kang, H. T., Kim, M. S., Shin, W. C., Sohn, H. Y. and Kim, J. S. 2014. Anti-inflammatory effects of extracts and their solvent fractions of rice wine lees. *J. Life Sci.* **24**, 843-850.
- Seo, G. U., Choi, S. Y., Kim, T. W., Ryu, S. G., Park, J. H. and Lee, S. C. 2013. Functional activities of makgeolli by-products as cosmetic materials. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 505-511.
- Shin, M. O., Kang, D. Y., Kim, M. H. and Bae, S. J. 2008. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity

- stimulation of Makgeoly fractions in various cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 288-293.
26. Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152-178.
27. Sweeney, J. D., Hoerning, L. A., Behrens, A. N., Novak, E. and Swank, R. T. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of *in-vitro* hypersensitivity to ristocetin. *Amer. J. Clin. Path.* **93**, 522-525.
28. Takahashi, K., Izumi, K., Nakahata, E., Hirata, M., Sawada, K., Tsuge, K., Nagao, K. and Kitagaki, H. 2014. Quantification and structural determination of glucosyceramides contained in sake lees. *J. Oleo. Sci.* **63**, 15-23.
29. Valentina, U., Fabcic, J. and Stampar F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**, 185-192.
30. Wanatanabe, T. and Yamamoto, A. 2009. Anti-obesity effect of sake lees indigestive products. *Food. Style* **21** **13**, 80-83.
31. Wang, S. J., Lee, H. J., Cho, J. Y., Jang, M. Y., Park, K. H. and Moon, H. H. 2012. Inhibition effect against the rat blood plasma oxidation of the makgeolli (Takju) Korean rice wine. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 116-122.
32. Yoo, J. M., Kang, Y. J., Pyo, H. B., Choung, E. S., Park, S. Y., Choi, J. H., Han, G. J., Lee, C. H. and Kim, T. J. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* **20**, 1838-1843.

초록 : 우국생 탁주 주박의 항혈전 및 항산화 활성

김미선¹ · 이예슬¹ · 김종식² · 신우창³ · 손호용^{1*}

(¹안동대학교 식품영양학과, ²안동대학교 생명과학과, ³(주)국순당)

각각의 나라는 민족의 공감성과 문화성이 깃든 고유의 술을 가지고 있으며, 우리나라에는 고유의 전통주 막걸리(탁주)가 있다. 본 연구에서는 주박을 이용한 고부가가치 향장소재 개발을 목표로, 상업적 시설에서 대량생산된 우국생 주박의 ethanol 및 열수 추출물로부터 n-hexane, ethylacetate, butanol을 이용한 순차적 유기용매 분획물과 물 잔류물을 조제한 후, 이들의 혈액응고 저해활성, 혈소판 응집저해 활성 및 인간 적혈구 용혈활성 및 항산화 활성을 평가하였다. 우국생 주박의 수분함량은 80.3%, pH 3.94, brix 13.0 및 알코올 함량은 약 1.8%이었으며, ethanol 추출의 경우 추출효율은 6.62%로 열수 추출의 2.1%보다 3.15배 높은 수율을 나타내었다. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석결과 주박 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획물에서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 특히 폴리페놀 함량은 매우 높게 나타났다(128 mg/g). 혈액응고 저해활성을 평가한 결과, ethanol 추출물의 ethylacetate 분획물에서는 5 mg/ml 농도에서 TT, PT, aPTT 모두 15배 이상의 연장된 응고시간을 나타내어 매우 강력한 thrombin, prothrombin 및 coagulation factor 저해활성을 나타내었다. 혈소판 응집저해능 평가에서는 ethanol 추출물의 butanol 분획 및 물 잔류물에서 항혈전제로 사용되고 있는 aspirin 보다 우수한 응집저해능을 확인하였다. 상기 10종 시료들은 0.5 mg/ml 농도까지 적혈구 용혈활성이 나타나지 않았으며, 양호한 radical 소거능을 나타내었다. 본 연구결과는 사료 및 비료로 활용되고 있는 우국생 주박의 활성분획물을 이용하는 경우 고부가가치 항혈전제 개발이 가능함을 제시하고 있다.