

Evaluation of *in-vitro* Antithrombosis Activity of Lees of Korean Traditional Wine

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

¹Dept. of Food and Nutrition, and ²Dept. of Life Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

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

Received May 20, 2014 / Revised May 28, 2014 / Accepted May 28, 2014

In this study, ethanol and hot water extracts of lees from Korean traditional wine (J-B, J-S, J-Y, J-H, and J-W) were prepared, and their effects on blood coagulation, platelet aggregation, and hemolysis of human red blood cells (hRBCs) were investigated to develop functional food ingredients from lees. The pH and brix of the lees ranged from 3.90 to 4.29 and 5.0 to 27.0°, respectively, and there was a huge difference in the water and ethanol content among the lees. The nuruk and additives used affected the color and physicochemical properties of lees. The J-W takju made from only rice and traditional nuruk, which has 13° brix and 1.8% of alcohol, has potential as functional food ingredient. With regard to the extraction yields of lees, higher yields were obtained from J-H, which contains different medicinal plants, in ethanol, followed by J-W, J-B, J-S, and J-Y. Higher extraction yields of lees were obtained from J-S in hot water, followed by J-B, J-W, J-H, and J-Y, respectively. The ethanol extract of J-H and the hot water extract of J-Y had the highest contents of total polyphenol and total flavonoids among the lees extracts. The 10 lees extracts did not show hemolysis activity against hRBCs up to 5 mg/ml. In an anticoagulation activity assay, the ethanol extracts of three yakju lees (J-B, J-S, and J-Y) and the hot water extract of J-W inhibited thrombin activity, whereas the hot water extract of J-B, J-S, and J-H inhibited blood coagulation factors. In an antiplatelet aggregation activity assay, only the J-W takju lees showed significant inhibition activity. Our results suggest that lees from traditional wine had high potential as a novel antithrombosis agent.

Key words : Anticoagulation, anti-platelet aggregation, Korean traditional wine, lees of rice wine, hemolysis

서 론

인체의 혈액은 심장과 혈관의 순환계를 흐르고 있는 액체로 다양한 혈구 세포와 혈장으로 구성되어 있으며, 산소, 영양분 및 노폐물의 운반 기능과 체온유지, 삼투압 조절, 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 등의 항상성 및 생체 방어 기능을 수행하고 있다[2]. 따라서 생명유지에 필수적인 혈액의 손실을 막기 위해 출혈이 나타나는 경우 즉각적인 혈액 응고반응이 나타나야 하며, 지혈이 된 이후에는 생성된 혈전을 분해, 제거하여 원활한 혈액순환을 유지하여야 한다. 혈액 응고반응은 혈관벽에 혈소판(platelet)이 점착, 응집하여 혈소판 혈전을 형성한 후, 다양한 응고인자(coagulation factors) 및 응고효소(prothrombin 및 thrombin)를 포함하는 혈액 응고계가 활성화되어 최종적으로 피브린 혈전이 형성되

는 것으로 알려져 있다[27, 28]. 따라서 과다한 혈액응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환 예방을 위해서는 혈액 응고 저해, 혈소판 응집 저해 및 혈전 용해가 필요하며, 현재는 헤파린, 쿠마린, 아스피린 및 유로키네이즈 등이 임상에서 사용되고 있다[12]. 그러나 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정[10, 12]으로, 최근에는 상대적으로 경제성이 우수하면서 안전성이 확보된 식용, 약용 천연물[11] 및 한약제[6, 24] 등에서 항혈전제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 주박은 쌀, 물, 누룩, 효모, 곰팡이, 유산균 등을 이용하여 술을 제조한 후, 술을 걸러내는 과정에서 만들어지는 부산물로, 술지게미, 재강 또는 아레기 등으로 불리며, 특히, 쌀을 주원료로 하는 탁주 및 약주의 주박은 식량이 부족하던 시기에는 구황식품으로 이용되었다. 일반적으로 탁주 및 약주 제조시 원료 쌀의 도정 → 세미 → 찹미 → 수질 → 증자 및 냉각 → 입국제조 → 주모(밑술)제조 → 1차 발효 → 2차 발효 → 숙성 → 제성으로 이루어지며, 이중 가장 중요한 공정인 발효 공정은 누룩, 물 및 쌀 전분의 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 반응을 통해 완성된다. 제성과정 중 걸러진 찌꺼기인 주박은 상당량의 영양성분과 유용 생리활성 성분을 가지고 있는

*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.

것으로 알려져 있으며, 발효주와 마찬가지로 사용 원료기질 및 첨가물, 사용 누룩, 발효방법에 따라 그 성상과 생산량이 달라지게 된다[7, 15]. 최근 전통주에 대한 사회적 관심과 수요 증가로 탁주 및 약주의 제조 부산물인 주박 생성이 급속도로 증가되고 있으나, 현재 대부분의 주박은 별도의 용도를 찾지 못하여 농업용 퇴비[20] 또는 가축 사료로 이용되거나 폐기하고 있는 실정이다[16, 25].

현재까지 주박 이용에 대한 학술적 연구로는 주박의 향미 성분을 이용한 장아찌[8] 및 고추장[21] 등의 발효식품 제조, 주박의 알코올을 이용한 식초 제조, 주박을 이용한 가식성 필름 제조[3], 설기떡 제조[4] 및 국수 제조시의 첨가[14] 등 다양한 식품제조 연구가 있으며, 주박의 잔당을 이용한 효모포자 생산용 배지로 이용하고자 하는 연구[23]도 보고되어 있다. 또한 주박이 다양한 유용생리활성물질을 포함하고 있음[7, 15]이 알려지면서 주박의 기능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 현재까지 알려진 주박 추출물 및 분획물의 생리활성으로는 항당뇨[13, 18, 19], 비만 억제[31], 내분비 장애물질의 흡착 제거[1], 고혈압[16, 17], 항산화[18, 22, 32], nitrite 제거 효과[16] 등이 있으며, 최근에는 주박의 보습[29], 미백 및 주름개선[25, 33] 및 알레르기 개선 효과[9] 등이 보고되면서 화장품 향장 소재로의 개발 가능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 대량 생산본 연구에서는 국내에서 대량 생산되고 있는 탁주 및 약주 주박을 이용한 고부가가치 식품소재 개발을 위해, 상업적 시설에서 생산된 5종의 탁주 및 약주 주박의 열수 추출물 및 ethanol 추출물을 조제하고 이들의 혈액응고 저해활성, 혈소판 응집저해 활성 및 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였던 보고는 탁주 및 약주 주박을 이용한 고부가가치 식품소재 개발을 위해, 상업적 시설에서 생산된 5종의 탁주 및 약주 주박의 ethanol 추출물 및 열수 추출물을 조제하고 이들의 혈액응고 저해활성, 혈소판 응집저해 활성 및 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였으며, 그 결과 주박 추출물을 이용한 항혈전제 개발 가능성을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 주박은 2012년 (주)국순당에서 생산된 3

종의 약주 및 2종의 탁주 주박을 공급받아 사용하였으며, 각각의 주박 정보 및 발효주에 사용된 재료는 Table 1에 나타내었다. 5종 주박의 열수 추출물 제조를 위해서는 주박 시료 무게에 대해 5배의 증류수를 가한 후 100℃에서 30분간 고온 추출하였으며, 이후 추출액은 filter paper (Whatsman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 분말로 조제하였다. 한편 5종 주박의 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 분말시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, *in-vitro* 항혈전 활성 및 적혈구 용혈활성 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[10, 11]. 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 2012-KSD-2~KSD-6).

항응고 활성

항혈전 활성 중 혈액응고저해 활성은 시료의 thrombin time (TT), prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT) 을 측정하여 평가하였다[10, 11]. 혈액 응고에서 중추적 역할을 수행하는 thrombin의 활성을 평가하는 TT는 37℃에서 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, 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. Thrombin저해 활성은 3회 이상 반복한 시료 TT 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 TT 평균치의 비로 나타내었다[24]. 한편 PT는 외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로

Table 1. List of 5 different lees of Korean traditional wine used in this study and their pH, brix, and alcohol content

Samples	Products	pH	brix	Water content (%)	Alcohol (% v/v)	Remarks
J-B	Yakju	4.19	10.0	46.0	1.0	rice, starch, nuruk, medicinal plant
J-S	Yakju	3.90	5.0	51.6	1.6	rice, starch, nuruk
J-Y	Yakju	4.29	7.0	36.7	1.4	rice, starch, fructose, nuruk
J-H	Takju	4.16	27.0	59.8	1.5	rice, e-hwa nuruk, medicinal plant
J-W	Takju	3.94	13.0	80.3	1.8	rice, nuruk

측정하는 방법으로, 혈장 70 μ l와 다양한 농도의 시료 10 μ l를 coagulometer 의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 μ l의 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[11]. 내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정의 경우에는, 표준 혈장 70 μ l와 다양한 농도의 시료 10 μ l를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 분간 가온 후, 65 μ l의 aPTT reagent를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65 μ l 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[10-12].

혈소판 응집 저해 활성

항혈전 활성 중 혈소판 응집저해 활성은, 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다[27, 28]. 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)은 적십자로부터 공급 받았으며 PRP의 전처리 및 수세과정은 기존의 보고[6, 11]와 동일하게 하였으며, 수세된 혈소판은 suspending buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 0.49 mM MgCl₂, 0.25% gelatin, pH 7.4)에 현탁하여 최종 혈소판 농도가 5x10⁸/ml이 되도록 조정하였다. 혈소판 응집은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, U.S.A)를 사용해 37°C에서 측정하였으며, 10 mM CaCl₂ 50 μ l, suspending buffer 147.5 μ l, 시료 5 μ l 가 포함된 반응 cuvette 에 혈소판 50 μ l을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 μ l를 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 under는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다[28]. 시료의 혈소판 응집 저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under값의 비를 백분율로 나타내었다[11, 28].

인간 적혈구 용혈 활성 평가

주박 추출물의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100 μ l를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100 μ l를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며,

이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100 μ l를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다[24]. 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. 용혈활성은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

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

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

기타 분석

주박 시료의 색차는 색차계(Super color SP-80 Colormeter, Tokyo Denshoku Co., Japan)로 분석하였으며, 명도(lightness, L), 적색도(redness, a), 황색도(yellowness, b)를 3회 반복 측정하여 색차(ΔE)를 계산하였다[14]. 표준 백색판은 L값이 92.39, a값이 -0.08, b값이 1.39이었으며, 색차는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

Total flavonoid (TF)의 함량 측정은 기존의 보고된 방법[26]에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 methanol교반 추출하고 여과한 추출액 400 μ l에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin을 사용하였다. Total polyphenol (TP) 함량은 시료 400 μ l에 50 μ l의 Folin-ciocalteau, 100 μ l의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다[30]. 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다[5, 11]. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

통계분석

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





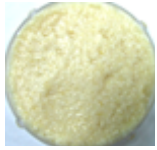
결과 및 고찰

주박 추출물 제조 및 추출물의 이화학적 특성

3종 약주(J-B, J-S, J-Y) 및 2종 탁주(J-H, J-W) 주박의 pH, brix, 수분 및 알코올 함량은 Table 1에 나타내었으며, 각각 주박의 색차는 Table 2에 나타내었다. 주박의 pH는 3.90~4.29의 유사한 범위를 나타내었으나, brix의 경우 5.0(J-S 시료)에서

Table 2. The color differences of 5 different lees of Korean traditional wine used in this study

Color differences	Lees of Korean traditional wine				
	J-B	J-S	J-Y	J-H	J-W
¹ L	44.73	53.78	63.56	85.38	66.49
² a	4.35	1.19	1.51	-1.43	1.16
³ b	13.73	12.25	11.21	7.87	10.98
⁴ ΔE	49.46	40.16	30.53	9.66	27.67

photos					
--------	---	---	---	---	---

¹L: degree of lightness (white +100~0 black), ²a degree of redness (red +100~-80 green), ³b degree of yellowness (yellow +70~-80 black), ⁴ΔE: overall color difference ($\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$).

27.0(J-H시료)까지 다양하게 나타났으며, 수분 및 알코올 함량에서도 시료에 따라 1.8배의 차이를 나타내었다. 전체적으로는 탁주 주박이 약주 주박보다 brix가 높으며, 수분함량이 높음을 알 수 있었다. 특히 J-W탁주 주박의 경우에는 수분함량이 80.3%, brix 13, 알코올 함량 1.8%를 함유하여 다른 주박 시료에 비해 다양한 식품제조에 용이하게 이용 가능하리라 판단되었으며, J-H 탁주 주박의 경우에도 높은 brix와 수분함량, 알코올 함량을 나타내었으나, 발효중 첨가된 한방약재를 포함하고 있어 식품소재로 사용은 제한이 있으리라 판단되었다. 5종 주박의 색차분석 결과, 명도는 44.73~85.38, 적색도는 -1.43~4.35, 황색도는 7.87~13.73의 범위를 나타내어 주원료인 쌀보다는 사용한 누룩 및 첨가 부재료에 의해 색차가 결정되는 것으로 나타났다.

각각의 주박의 ethanol 추출효율과 추출물들의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량 분석 결과는 Table 3에 나타내었다.

추출효율은 J-H, J-W, J-B, J-S, J-Y의 순으로 높았으며, 탁주의 추출효율이 약주보다 높았다. 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량은 J-H 주박에서 가장 높았으며, J-W 및 J-S도 높은 함량을 나타내었다. 주박 추출물의 총당 및 환원당 함량은 388~475 mg/g 및 333~456 mg/g으로 상당량의 유리당을 함유하고 있었다. 한편 5종 주박의 열수 추출효율과 추출물들의 성분 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 추출효율은 J-S, J-B, J-W, J-H, J-Y의 순으로 높았으며, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량은 J-Y 주박에서 가장 높았다. 주박 추출물의 총당 및 환원당 함량은 304~628 mg/g 및 171~546 mg/g으로 당 함량의 차이가 크게 나타났다. 전체적으로 ethanol 추출 효율이 물 추출물보다 높았으며, 특히 J-H 및 J-Y 주박의 경우에는 ethanol 추출이 열수 추출보다 8.5배 및 6.8배 높은 추출효율을 보였다. 이는 발효 중 첨가된 부재료의 지용성 성분이 충분히 발효액으로 용출되지 못한 결과로 이해되며, 또한 발효중의 원료쌀의

Table 3. The yields of ethanol extract from 5 different lees of Korean traditional wine and component assay of the lees extracts

Samples	Extraction yields (%)	Component (mg/g-extract)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
J-B	5.69	2.7±0.3	11.6±0.1	389.4±19.5	387.1±2.3
J-S	4.85	1.2±0.1	33.2±0.8	388.9±6.0	333.7±2.8
J-Y	4.73	0.6±0.1	17.5±0.3	398.1±7.8	352.4±3.9
J-H	16.15	4.2±0.1	44.3±0.8	475.5±22.8	456.7±11.3
J-W	6.62	1.0±0.1	35.0±1.1	394.1±17.0	367.8±15.0

Table 4. The yields of hot water extract from 5 different lees of Korean traditional wine and component assay of the lees extracts

Samples	Extraction yields (%)	Component (mg/g-extract)			
		Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
J-B	2.89	3.5±0.9	8.1±0.0	376.7±2.3	203.5±1.6
J-S	4.40	1.5±0.3	21.8±0.8	401.1±35.0	48.4±0.0
J-Y	0.69	6.3±0.9	74.4±2.9	628.1±27.6	546.0±0.0
J-H	1.89	1.0±0.1	27.2±1.0	304.7±7.1	171.5±1.2
J-W	2.10	0.7±0.0	34.5±1.1	312.3±23.4	222.4±0.8

Table 5. Hemolytic activity of the solvent extracts prepared from 5 different lees of Korean traditional wine against human red blood cell (hRBC)

Chemicals/Extract (mg/ml)	Hemolysis against hRBC (%)		
DMSO	0		
Triton-X 100 (1.0).	100±1.4		
Amphotericin B (0.02)	99.4±2.1		
Lees extract	Ethanol extract	Hot water extract	
J-B (5.0)	-2.5±1.3	1.7±0.5	
J-S (5.0)	-0.6±1.5	-3.2±2.2	
J-Y (5.0)	-4.7±2.1	-1.5±1.0	
J-H (5.0)	-4.3±1.8	0.5±0.3	
J-W (5.0)	-2.5±0.7	1.9±1.6	

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).

분해 정도와도 관련된 것으로 추측된다. 특히, J-H 주박에서는 ethanol 추출물에서 총당 및 환원당 함량이 열수 추출물보다 높게 나타나 일반적인 주박 추출물과는 차이를 나타내었다.

주박 추출물의 적혈구 용혈활성 및 항혈전 활성

인간 적혈구를 이용한 주박 추출물의 용혈활성을 평가하였다. 대조구로 사용된 triton X-100과 amphotericin B는 강력한 용혈활성을 나타내었으나, 주박 열수 및 ethanol 추출물들은 5.0 mg/ml 농도까지 2% 이하의 용혈활성을 나타내어 적혈구 용혈에 따른 급성독성은 나타나지 않으리라 판단되었다 (Table 5). 현재까지 주박에 대한 많은 생리활성에 대한 연구가 진행되었으나, 혈전생성 억제에 미치는 인간 혈액응고인자 및 응고효소 저해는 알려진 바 없으므로, 주박 추출물 시료의 항응고 활성을 TT, PT, aPTT를 각각 측정하여 평가하였다. 먼저

대조구로 사용된 aspirin (1.5 mg/ml)은 무처리구에 비해 TT는 2.6배, PT는 1.7배, aPTT는 1.4배 연장시켜 우수한 혈액응고 저해 활성을 나타내었으며[11, 12], 주박의 ethanol 추출물의 경우, J-B, J-S 및 J-Y의 3종의 약주 주박에서 유의적인 thrombin 저해 활성, J-S에서 유의적인 prothrombin 저해활성 및 J-B에서 혈액 응고인자 저해활성을 나타내어 전체적으로 약주 주박이 탁주 주박보다 우수한 항혈전 활성을 나타내었다. 특히하게 J-Y 주박의 ethanol 주박은 혈액응고인자 활성화를 통한 혈전생성 촉진작용이 유의적으로 나타났다. 한편 주박의 열수 추출물의 경우, J-W 탁주 주박에서 유의적인 thrombin 저해 활성과 J-B, J-S 및 J-H 주박에서 유의적인 혈액 응고인자 저해 활성을 확인하였다. 이러한 결과는 폐기되고 있는 주박으로부터 항혈전 활성 물질 개발이 가능함을 시사하고 있다.

주박 추출물의 혈소판 응집저해 활성

혈소판은 다양한 혈구세포와 함께 내피세포의 손상으로 노출된 collagen 등과 결합하여 1차 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성하여 혈전생성을 개시하는 중요한 세포이다[28]. 주박 ethanol 및 열수 추출물의 혈소판 응집능을 평가하기 위해, 먼저 용매 대조구로 사용된 DMSO의 혈소판 응집능을 평가한 결과 amplitude 18Ω, area under 118.8을 나타내었으며, 상업적으로 이용되고 있는 혈소판 응집저해제인 아스피린(0.25 mg/ml)은 amplitude 11Ω, area under 68.9를 나타내어 DMSO의 58.4% 혈소판 응집능을 나타내었으며, 농도의존적인 혈소판 응집저해를 나타내었다(Fig. 1, Table 7). 한편 주박 ethanol 추출물(0.25 mg/ml)의 경우 J-W에서 amplitude 15Ω와 area under 92.0의 값을 나타내어 아스피린보다는 미약하지만 우수한 혈소판 응집저해를 나타내었으며, 열수 추출물에서도 J-W에서 amplitude 12Ω와 area under 70.4의 값을 나타내어, 아스피린에 필적하는 혈소판 응집저해 활성을 확인하였다. 본 연구결과는 다양한 약주 및 탁주 주박이 항혈전 활성을 가지고 있으며, 활성물질 정제를 통해 주박으로부터 항혈전제 개발이 가능함을 제시하고 있다.

Table 6. Effect of the solvent extracts prepared from 5 different lees of Korean traditional wine on blood clotting

Samples	Conc. (mg/ml)	Anti-coagulation activity (× 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	2.6±0.1 ^c	1.7±0.0 ^c	1.4±0.1 ^a	2.6±0.1 ^c	1.7±0.0 ^b	1.4±0.1 ^c
J-B	5	1.2±0.0 ^b	1.1±0.0 ^a	1.3±0.1 ^b	1.1±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.2±0.2 ^b
J-S	5	1.2±0.1 ^b	1.3±0.0 ^b	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a	1.3±0.1 ^{bc}
J-Y	5	1.2±0.0 ^b	1.1±0.1 ^a	0.7±0.0 ^c	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a
J-H	5	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.1 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.2±0.0 ^b
J-W	5	1.1±0.1 ^{ab}	1.1±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.4±0.1 ^b	1.1±0.1 ^a	1.0±0.0 ^a

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

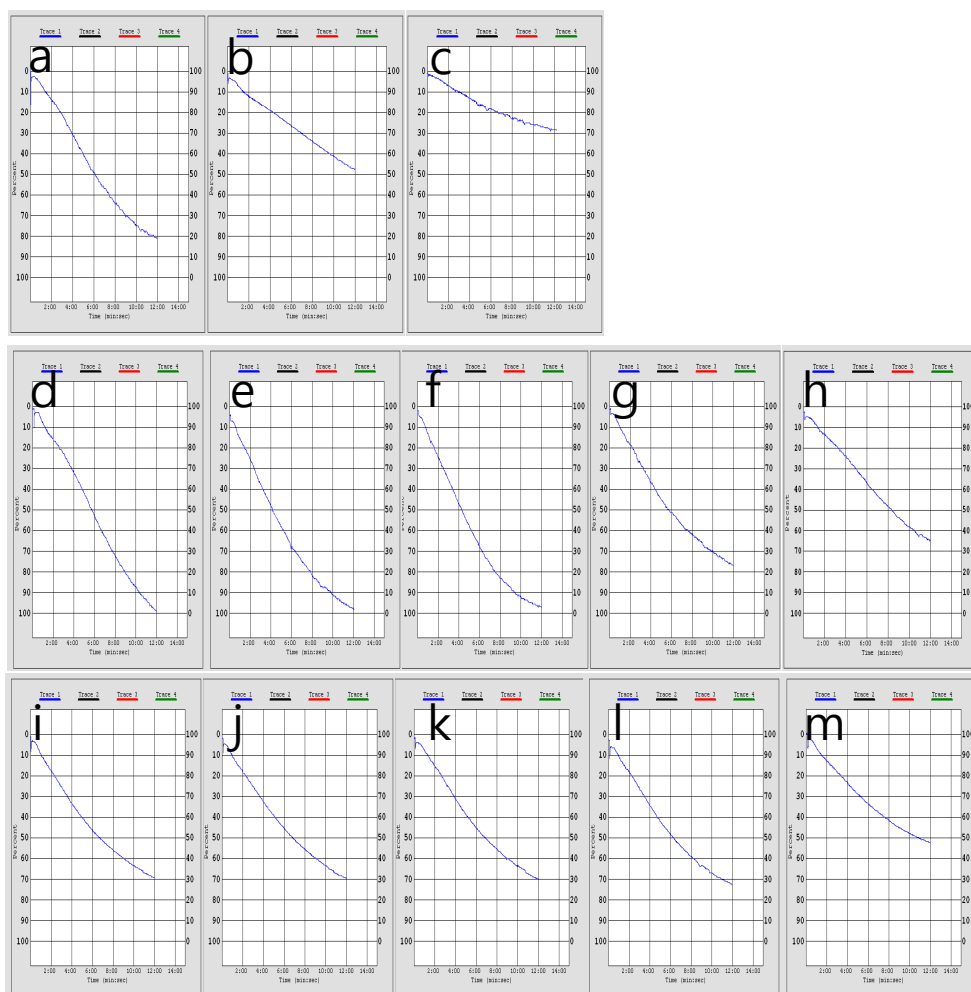


Fig. 1. Diagrams of impedance changes during platelet aggregation after addition of aspirin and the extracts prepared from 5 different lees of Korean traditional wine in whole blood aggregometer. (a) DMSO, (b) aspirin (0.25 mg/ml), (c) aspirin (0.5 mg/ml), (d)~(h) ethanol extract of J-B, J-S, J-Y, J-H and J-W, and (i)~(m) hot water extract of J-B, J-S, J-Y, J-H and J-W, respectively. Platelet aggregation was induced by addition of 2.5 μ l of collagen (1 mg/ml) into cuvette containing 50 μ l of washed PRP and measured the impedance changes for 12 min.

Table 7. Platelet aggregation activity of the solvent extracts prepared from 5 different lees of Korean traditional wine

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
J-B (0.25)	24	3	32	146.4	124.1	17	2	26	116.7	98.9
J-S (0.25)	23	3	18	164.6	139.5	16	2	27	111.5	94.5
J-Y (0.25)	23	3	18	170.7	144.7	17	2	33	113.1	95.9
J-H (0.25)	18	2	23	129.7	109.9	17	2	31	114.2	96.7
J-W (0.25)	15	2	45	92.0	77.9	12	2	38	83.1	70.4

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.

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. *Thromb Res* **131**, 173-177.
- Cho, S. Y., Park, J. W. and Rhee, C. 1998. Edible films from protein concentrates of rice wine meal. *Korean J Food Sci Technol* **30**, 1097-1106.
- 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.
- Choi, B. B., Lee, H. J. and Bang, S. K. 2004. Studies on the amino acid, sugar analysis and antioxidative effect of extracts from *Artemisia* sp. *Korean J Food Sci Technol* **17**, 86-91.
- Hwang, H. J., Kang, M. S., Kim, B. K., Jung, B. M. and Kim, M. H. 2012. The effect of *Opuntia humifusa* seed extracts on platelet aggregation and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* **22**, 1680-1687.
- 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 Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 383-389.
- 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, J. I., Jang, H. S., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J Microbiol Biotechnol* **37**, 133-139.
- Kim, M. S. and Sohn, H. Y. 2014. Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J Life Sci* **24**, 515-521.
- Kim, M. S., Oh, I. T., Jun, D. Y., Lee, J. Y., Sohn, H. Y., Kwak, D. Y., Seo, M. C., Woo, K. S., Ko, J. Y., Jung, T. W., Nam, M. H., Woo, M. H. and Kim, Y. H. 2013. Anticoagulant activity and fibrinolytic activities of Hwanggeumchal sorghum *in vitro*. *J Life Sci* **23**, 1460-1470.
- 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. *Korean 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. *Korean 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. *Korean 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 Korean 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). *Korean J Food Culture* **24**, 338-343.
- Lee, H. S., Hong, K. H., Yoon, C. H., Cho, W. K. and Kim, S. M. 2009. Glycemic index and oral glucose tolerance test of Takju (Korean turbid rice wine) lees extract. *Korean J Food Culture* **23**, 662-665.
- 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. *Korean 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, K. S. and Kim, D. H. 1991. Effect of sake cake on the quality of low salted kochuzang. *Korean J Food Sci Technol* **23**, 109-115.
- Lim, J. M., Kwon, H. J., Yong, S. E., Choi, J. H., Lee, C. H., Kim, T. J., Park, P. S., Choi, Y. H., Kim, E. M. and Park, S. Y. 2013. Antioxidant activity and quality characteristics of rice wine cakes cookies with different ratio of *Astragalus membranaceus*. *Korean J Food Cook Sci* **29**, 11-18.
- Lim, Y. S., Bae, S. M. and Kim, K. 2004. Production of yeast spores from rice wine cake. *Korean J Microbiol Biotechnol* **32**, 184-189.
- Ryu, H. Y., Ahn, S. M., Kim, J. S. and Sohn, H. Y. 2010. Evaluation of *in-vitro* anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J Life Sci* **20**, 922-928.
- 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 Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 505-511.
- 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-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* **299**, 152-178.
- Sweeney, J. D., Hoerning, L. A. and Fitzpatrick, J. E. 1989. Whole blood aggregation in Von willebrand disease. *Am J*

- Hematol* **32**, 190-193.
28. 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 Pathol* **93**, 522-525.
29. Takahashi, K., Izumi, K., Nakahata, E., Hirata, M., Sawada, K., Tsuge, K., Nagao, K. and Kitagaki, H. 2014. Quantification and structural determination of glucosylceramides contained in sake lees. *J Oleo Sci* **63**, 15-23.
30. 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.
31. Wanatanabe, T. and Yamamoto, A. 2009. Anti-obesity effect of sake lees indigestive products. *Food Style* **21** **13**, 80-83.
32. 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. *Korean J Food Preserv* **19**, 116-122.
33. 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 : 전통주 주박의 항혈전 활성 평가

김미선¹ · 이예슬¹ · 김종식² · 신우창³ · 손호용^{1*}

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

전통주 주박을 이용한 고부가가치 식품소재 개발을 위해, 상업적 시설에서 생산된 3종 약주(J-B, J-S, J-Y) 및 2종 탁주(J-H, J-W) 주박의 ethanol 추출물 및 열수 추출물을 조제하고 이들의 혈액응고 저해활성, 혈소판 응집저해 활성 및 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 5종 주박의 pH는 3.90~4.29로 유사하였으나, brix는 5.0~27.0으로 다양하게 나타났으며, 수분 및 알코올 함량에서도 시료에 따라 1.8배의 차이를 나타내었다. 주박의 색차와 성분은 첨가된 부재료 및 사용누룩에 좌우되었으며, J-W 주박의 경우 수분함량이 80.3%, brix 13, 알코올 함량 1.8%를 함유하여 다른 주박에 비해 다양한 식품제조에 용이하게 이용 가능하리라 판단되었다. Ethanol 추출효율은 J-H, J-W, J-B, J-S, J-Y의 순, 열수 추출효율은 J-S, J-B, J-W, J-H, J-Y의 순으로 높았으며, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량은 ethanol 추출물 중에서는 J-H, 열수 추출물 중에서는 J-Y 주박에서 가장 높았다. 5종 주박의 10종 추출물은 모두 5 mg/ml 농도까지 인간 적혈구에 대한 용혈활성이 나타나지 않았으며, J-B, J-S, J-Y의 약주 주박의 ethanol 추출물에서 유의적인 혈액응고저해 활성이 나타났으며, J-W 탁주 주박의 열수 추출물에서 thrombin 저해 활성과 J-B, J-S 및 J-H 주박 열수 추출물에서 혈액 응고인자 저해활성을 확인하였다. 혈소판 응집저해 활성평가의 경우 J-W 탁주 주박의 ethanol 및 열수 추출물에서만 아스피린에 필적하는 우수한 활성이 확인되었다. 본 연구결과는 다양한 약주 및 탁주 주박이 항혈전 활성을 가지고 있으며, 주박으로부터 항혈전제 개발이 가능함을 제시하고 있다.