

## 이화누룩의 항혈전 활성

김미선<sup>1</sup>, 이예슬<sup>1</sup>, 김종식<sup>2</sup>, 신우창<sup>3</sup>, 손호용<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>안동대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>안동대학교 생명과학과

<sup>3</sup>(주) 국순당

Received: May 29, 2014 / Revised: June 17, 2014 / Accepted: June 17, 2014

### In-vitro Anti-thrombosis Activity of Ehwa Nuruk

Mi-Sun Kim<sup>1</sup>, Ye-Seul Lee<sup>1</sup>, Jong Sik Kim<sup>2</sup>, Woo-Chang Shin<sup>3</sup>, and Ho-Yong Sohn<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, and <sup>2</sup>Department of Life Science, Andong National University, Andong 760-749, Republic of Korea

<sup>3</sup>Research Institute, Kooksoondang Brewery Co. Ltd., Seongnam 460-120, Republic of Korea

Ehwa nuruk (EN), a traditional Korean alcoholic rice beverage, is manufactured from pulverized wet rice and the needles of pine trees. In this study, the ethanol extract of EN and its subsequent organic solvent fractions were prepared, and their *in-vitro* anti-thrombosis activity evaluated. In an anti-coagulation assay, only the ethylacetate (EA) fraction of the ethanol extract showed significant extensions of thrombin time, prothrombin time and activated partial thromboplastin time. In a platelet aggregation assay, the water residue of the ethanol extract exhibited aggregation inhibitory activity. Our results suggest that the EA fraction has potential as a new anticoagulation agent and EN could be used as a novel resource for anti-thrombosis agents. This report provides the first evidence of the anti-thrombosis activity of EN.

**Keywords:** Anti-coagulation, anti-platelet aggregation, ehwa nuruk

이화누룩(이화곡)은 이화주를 제조할 때 사용되는 전통 쌀 누룩으로 증자하지 않은 쌀을 물에 불린 후 분쇄하고 이를 8-10 cm의 구형으로 성형하여 술잎으로 띄워 발효시킨 누룩이다[9]. 통상의 증자한 밀을 분쇄하여 사용하는 밀 누룩과는 달리, 증자하지 않은 쌀을 분쇄하여 사용하는 쌀 누룩으로 *Aspergillus oryzae* 곰팡이와 *Hansenula* sp. 효모가 누룩의 우점종으로 알려져 있다[7]. 배꽃이 필 무렵부터 담근다고 해서 ‘이화주’라는 이름이 붙은 이 술은, 이화누룩 이외의 다른 효모나 곡을 첨가하지 않고 제조되어 특유의 부드러운 맛과 향이 있으며, 수운잡방과 같은 우리나라 고문헌에도 자주 등장할 정도로 고려시대부터 음용되었으며 서민층보다는 양반가에서 즐겨 마셨다고 전해지고 있다[8].

이화주는 이화누룩(쌀 누룩)에 떡으로 빻은 술이라, 주질

은 고점도의 걸쭉한 흰색 죽과 같은 독특한 특성을 지니며, 아미노산과 탄수화물 등 영양가가 높으며, 순하고 단맛이 있어서 옛날에는 아기들에게 젖 대신 먹었다고도 전해진다[13]. 그러나 국내의 이화누룩 및 이화주에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 1990년 초에 이화주 양조종의 미생물상[7], 유기산, 알코올농도, fusel oil 생산 및 관능성 변화[8, 9] 등에 대한 보고가 있었으나, 이후 진행된 바 없으며 최근 전통주에 대한 관심이 증가되면서 한방이화주에 대한 성분과 미백 및 주름 억제효과가 보고되었다[12, 13]. 실제 전통주의 관능성 및 유용 활성은 발효방법뿐만 아니라, 사용 누룩 및 사용원료에 따라 달라진다[12, 14]. 따라서 본 연구에서는 이화주의 과학적 효능 평가의 일환으로 먼저 이화누룩의 생리 활성을 평가하고자 하였다. 실험에 사용한 이화누룩은 상업적 시설((주)국순당, 성남, 경기도, 한국)에서 대량 제조된 누룩(수분함량 13.6%)으로, 누룩의 10배의 물을 가해 현탁한 후 희수한 상등액의 pH는 4.37, brix는 1.0을 나타내었다. 이화누룩의 ethanol 추출물 제조를 위해서는 누룩 무게에 대해 10배의 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals

### \*Corresponding author

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

E-mail: hysohn@anu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

**Table 1. Yields of ethanol extract and its solvent fractions of the Ehwa nuruk and their total polyphenol and total flavonoid contents.**

Extract/ Fraction	Extraction/ Fraction yield (%)	Content (mg/g)	
		Total polyphenol	Total flavonoid
Ethanol extract	4.23 ± 0.3	7.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>
Hexane fraction	34.6 ± 0.5	2.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>c</sup>
Ethylacetate fraction	5.1 ± 0.1	9.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	3.4 ± 0.1 <sup>e</sup>
Butanol fraction	27.4 ± 0.1	8.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>d</sup>
Water residue	33.2 ± 1.3	9.3 ± 0.1 <sup>d</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>

Data are presented as the mean ± SD of three determinations. Different letters within a column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Co., Ltd., Korea)을 가한 후 상온에서 24시간, 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)하여 분말로 조제하였다. 이후, 조제된 분말을 증류수에 현탁한 후, hexane, ethylacetate, butanol로 순차적 분획하였으며, 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. 이화누룩의 ethanol 추출물 및 이의 분획물의 수득율 및 성분 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. ethanol 추출물의 수득율은 4.23 ± 0.3%이었으며, 순차적 분획시 ethanol 추출물의 34.6%는 hexane 분획으로, 33.2%는 물 잔류물로 이행되었으며, ethylacetate 분획물은 ethanol 추출물의 5.1%를 차지하였다. 이러한 결과는 이화누룩 100 g에 대해 ethylacetate 분획물 약 0.215 g을 얻게 됨을 의미하며, ethylacetate 분획은 상당히 정제된 상태로 판단된다. 조제된 이화누룩 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀(total polyphenol: TP) 및 총 플라보노이드(total flavonoid: TF) 함량을 측정할 결과, 한방 약재 및 베리류보다는 낮은 함량의 2.5-9.3 mg/g의 TP 및 0.7-3.4 mg/g의 TF 함량을 나타내었으며[1, 5, 20], ethylacetate 분획에서 가장 높은 TP 및 TF 함량을 나타내었다. 이때 TP 함량은 추출 검액 400 µl에 50 µl의 folin-ciocalteau, 100 µl의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액을 넣고, 실온에서 1시간 방치한 후 725 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다[17]. TF 함량은 시료를 18시간 메탄올로 교반 추출하고, 여과한 추출 검액 400 µl에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고 다시 1 N NaOH 40 µl를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 표준시약으로는 rutin을 사용하였다[20]. 조제된 이화누룩 추출물 및 분획물의 항혈전 활성을 평가하기 위해 혈액응고 저해활성과 혈소판 응집 저해 활성을 측정하였다. 혈액응고 저해활성은 기존에 보고된 방법에 준해 평가하였으며[15], thrombin time (TT),

prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하였다. 먼저 혈액 응고에서 중추적 역할을 수행하는 thrombin의 활성을 평가하는 TT[3]는 37°C에서 0.5 U thrombin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 50 µl와 20 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µl, 다양한 농도의 시료 10 µl를 Amelung coagulometer KC-1A (Amelung, Lemgo, Germany)의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 표준혈장(MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China) 100 µl를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며[15], PT는 외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 방법[3]으로, 혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료 10 µl를 coagulometer의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 130 µl의 PT reagent (MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다[15]. 한편 내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 aPTT 측정[3]의 경우에는, 표준혈장 70 µl와 다양한 농도의 시료 10 µl를 coagulometer 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 65 µl의 aPTT reagent (MD Pacific Technology Co., Ltd., Huayuan Industrial Area, China)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 반응하였다. 이후 65 µl CaCl<sub>2</sub> (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였다[15]. 이때 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였으며, TT, PT 및 aPTT 연장활성은 각각 3회 이상 반복한 시료 실험의 평균치를 용매 대조구인 DMSO의 실험 평균치의 비로 나타내었다[6, 15]. 실험 결과는 SPSS 21.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하였으며, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다. 혈액응고 저해활성 분석결과, 대조구로 사용된 아스피린(1.5 mg/ml)은 TT, PT, aPTT를 무첨가구에 비해 각각 2.6배, 1.7배 및 1.4배 연장시켜 우수한 항혈전 효과를 나타내었으며, 이화누룩의 ethanol 추출물(5 mg/ml) 처리시에는 TT, PT, aPTT의 변화가 나타나지 않았다. 분획물 중에서는 ethylacetate 분획에서만 대조구에 비해 각각 15배 이상 연장된 TT, PT, aPTT를 나타내었다(Table 2). 이화누룩의 항혈전 활성 평가를 위해 혈소판 응집 저해활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 혈소판은 다양한 혈구 세포와 함께 내피세포의 손상으로 노출된 collagen 등과 결합하여 1차 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성하여 혈전생성을 개시하는 중요한 세포[18]로, 혈소판의 비정상적인 응집은 혈전 생성을 촉진시켜 정상적인 혈액순환을 저해한다. 본 연구에서의 혈소판 응집저해 활성은 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항

**Table 2. Effect of the ethanol extract and solvent fractions of ehwa nuruk on blood coagulation.**

Samples	Conc. (mg/ml)	Anti-thrombosis activity <sup>a)</sup>		
		TT	PT	aPTT
DMSO	-	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
Aspirin	1.5	2.6 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.7 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
Ethanol extract	5	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>
Hexane fraction	5	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
Ethylacetate fraction	5	>15.0 <sup>d</sup>	>15.0 <sup>d</sup>	>15.0 <sup>d</sup>
	2.5	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>b</sup>
	1.25	1.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>
Butanol fraction	5	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>
Water residue	5	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>

<sup>a)</sup>Anti-thrombosis activity: Data are presented as relative clotting time based on solvent 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 ( $p < 0.05$ ).

값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다[18]. 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)은 적십자로부터 공급받았으며 PRP의 전처리 및 수제과정은 기존의 보고[6]와 동일하게 하였으며, 최종 혈소판 농도가  $5 \times 10^8/\text{ml}$ 이 되도록 조정하였다. 혈소판 응집은 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, USA)를 사용해 37°C에서 측정하였으며, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 50 µl, suspending buffer 147.5 µl, 시료 5 µl가 포함된 반응 cuvette에 혈소판 50 µl을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5 µl를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under를 측정하여 평가하였다[18]. 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제를 첨가하였

을 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[18]. 이화누룩 시료의 혈소판 응집 저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under 값의 비를 백분율로 나타내었다[6]. 먼저, 대조구로 사용된 혈소판 응집저해제인 아스피린은 농도의존적인 혈소판 응집 저해 활성을 나타내었으며, 0.25 mg/ml 농도에서 무첨가구에 비해 63.8%의 응집율을 나타내었다(Table 3). 반면 이화누룩의 ethanol 추출물(0.25mg/ml)은 혈소판 응집율이 123.9%로 증가되었으며, 물 잔류물을 제외한 분획물들도 혈소판 응집 촉진을 나타내었다. 물 잔류물의 경우, 무첨가구

**Table 3. Platelet aggregation activities of the ethanol extract and its solvent fractions of ehwa nuruk.**

Chemicals/Samples (mg/ml)	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under	PAR <sup>a)</sup> (%)
DMSO	22	4	20	153.7	100
Aspirin (1.0)	4	1	82	25.0	16.3
Aspirin (0.5)	11	1	52	61.5	40.0
Aspirin (0.25)	14	3	27	98.1	63.8
Ethanol extract	24	4	14	190.4	123.9
Hexane fraction	28	9	3	264.6	172.2
Ethylacetate fraction	27	4	10	217.9	141.8
Butanol fraction	28	4	17	210	136.6
Water residue	18	2	22	124.9	81.3

<sup>a)</sup>PAR: Platelet Aggregation Ratio.

Data are presented as a 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.

에 비해 81.3%의 혈소판 응집을 나타내어 동일농도의 아스피린에 비해 약한 응집저해를 나타내었다(Table 3). 따라서 이화누룩의 ethylacetate 분획은 혈액응고효소 및 혈액응고인자 저해를 통한 항혈전 활성이 나타남을 확인하였다. 최근 일본 청주 및 국내 전통주와 이들의 주박에서 미백 및 주름 개선 활성[4, 16], 보습효과[19], 항당뇨[21], 항산화 및 nitrite 소거활성[10, 22] 및 혈압강화효과[11] 등이 보고됨을 고려할 때, 누룩에서도 이와 유사한 활성이 나타나리라 예상되며[12], 향후 이화누룩의 추가적인 유용활성 평가가 필요하다고 판단된다. 본 연구결과는 이화누룩의 항혈전 활성에 대한 최초의 보고이며, 이화누룩 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획물이 혈액 응고저해제로 이용가능하며, 활성물질의 정제를 통해 위장 장애 등의 부작용을 나타내는 아스피린을 대체할 수 있는 항혈전제로 사용 가능성을 제시하고 있다.

## 요약

이화누룩은 증자하지 않은 쌀을 물에 불린 후 분쇄하고, 이를 솔잎으로 띄워 발효시킨 한국 전통누룩이다. 이화누룩의 기능성을 평가하기 위해 이화누룩의 에탄올 추출물과 이의 순차적 유기용매 분획물을 조제하고 항혈전 활성을 평가하였다. 그 결과, ethylacetate 분획물은 강력한 thrombin time, prothrombin time, aPTT 연장효과를 나타내었으며, 유기용매 분획후의 물 잔류물에서는 강력한 혈소판 응집저해능이 확인되었다. 본 연구결과는 이화누룩의 ethylacetate 분획이 신구의 항혈전제로 사용 가능성을 나타내며, 이는 이화누룩의 항혈전 활성에 대한 최초의 보고이다.

## Acknowledgments

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program (No. 112073-3), Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

## References

- Ahn SM, Ryu HY, Kang DK, Jung IC, Sohn HY. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of the fruit of *Prunus avium* L. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 195-200.
- Chen H, Qi X, He C, Yin Z, Fan D, Han G. 2013. Coagulation imbalance may not contribute to the development of portal vein thrombosis in patients with cirrhosis. *Thrombosis Res.* **131**: 173-177.
- Cheon JE, Baik MY, Choi SW, Nam CN, Kim BY. 2013. Optimization of makgeolli manufacture using several sweet potatoes. *Korean J. Food Nutr.* **26**: 29-34.
- Jeon HJ, Noda M, Murayama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. 2006. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9827-9833.
- Kim JI, Jang HS, Kim JS, Sohn HY. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 133-139.
- Kim MS, Sohn HY. 2014. Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J. Life Sci.* **24**: 515-521.
- Kim JO, Kim JG. 1993. Microbial and enzymatic properties related to brewing of traditional ewhaju. *Korean J. Soc. Food Sci.* **9**: 266-271.
- Kim JO, Kim JG. 1994. Major components (organic acids, alcohols, fusel oil) and sensory properties of traditional ewhaju during brewing. *Korean J. Soc. Food Sci.* **10**: 1-7.
- Kim JO, Nam SM, Kim JG. 1993. Changes in chemical composition of traditional ewhaju during brewing. *Korean J. Soc. Food Sci.* **9**: 272-277.
- Kwon SC, Jeon TW, Park JS, Kwak JS, Kim TY. 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 HS, Hong KH, Kim JY, Kim DH, Yoon CH, Kim SM. 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 SJ, Cho SW, Kwon YY, Kwon HS, Shin WC. 2012. Inhibitory effects of ethanol extracts from nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology* **40**: 117-123.
- Lee SJ, Kwon YY, Cho SW, Kwon HS, Shin WC. 2013. Effects of ehwa makgeolli containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 550-555.
- Park JS, Chung BW, Bae JO, Lee JH, Jung MY, Choi DS. 2010. Effect of sweet potato cultivars and koji types on general properties and volatile flavor compounds in sweet potato soju. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 468-474.
- Ryu HY, Ahn SM, Kim JS, Sohn HY. 2010. Evaluation of in-vitro anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J. Life Sci.* **20**: 922-928.
- Seo GU, Choi SY, Kim TW, Ryu SG, Park JH, Lee SC. 2013. Functional activities of makgeolli by-products as cosmetic materials. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 505-511.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.
- Sweeney JD, Hoerning LA, Behrens AN, Novak E, Swank RT. 1990. Thrombocytopenia after desmopressin but absence of in-vitro hypersensitivity to ristocetin. *Am. J. Clin. Path.* **93**: 522-525.
- Takahashi K, Izumi K, Nakahata E, Hirata M, Sawada K, Tsuge K, et al. 2014. Quantification and structural determination of glucosylceramides contained in sake lees. *J. Oleo. Sci.*

- 63:** 15-23.
20. Valentina U, Fabcic J, Stampar F. 2007. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* **107**: 185-192.
21. Wanatanabe T, Yamamoto A. 2009. Anti-obesity effect of sake lees indigestive products. *Food Style* 21 **13**: 80-83.
22. Wang SJ, Lee HJ, Cho JY, Jang MY, Park KH, Moon HH. 2012. Inhibition effect against the rat blood plasma oxidation of the makgeolli (Takju) Korean rice wine. *Korean J. Food Preserv.* **19**: 116-122.