

# Rhizopus oryzae KSD-815를 이용하여 제조된 R4 누룩의 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: February 12, 2015 / Revised: March 10, 2015 / Accepted: March 25, 2015

## In-vitro Anti-thrombosis Activity of R4-Nuruk Made from *Rhizopus oryzae* KSD-815

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

Nuruk has been used as fermentation starter in the alcohol industry for some time in Korea. Various bioactivities, such as anti-proliferative and anti-obesity, of R4 nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815 have been previously reported. In this study, the hot water and ethanol extract of R4 nuruk and their subsequent organic solvent fractions were prepared, and their anti-thrombosis activities were evaluated. The ethylacetate fraction showed strong anti-coagulation activity, and the ethylacetate and butanol fraction from hot water extract demonstrated platelet aggregation inhibitory activity, without hemolysis against human RBC. Our results suggest that R4 nuruk has the potential to act as a new anti-thrombosis agent.

**Keywords:** Anti-coagulation, anti-platelet aggregation, *Rhizopus oryzae* KSD-815, R4 nuruk

술은 알코올 성분이 있어 사람을 취하게 하는 음료를 말하며, 각각의 나라마다 민족의 공감성과 문화성이 깃든 고유 술을 가지고 있다[16]. 그 예로서, 프랑스의 와인, 러시아의 보드카, 네덜란드의 진, 일본의 사케 등이 있으며, 우리나라에는 고유의 전통주로 막걸리가 있다. 우리나라의 막걸리는 찹쌀 혹은 멥쌀을 주원료로 하여 누룩을 발효제로 사용하여 제조하며, 다양한 약용 및 식용 부재료를 첨가하여 우리나라의 고유한 방법으로 양조하고 있다. 특히 누룩은 전 세계적으로도 독특한 우리나라의 발효제이며, 전분의 당화효소로서의 역할뿐만 아니라 발효를 진행하는 곰팡이, 효모, 유산균의 접종원이라는 측면에서 중요하다[16]. 실제 전통주는 사용 누룩에 따라 술의 맛, 향, 색이 변화되므로 누룩은 전통주 품질에 가장 중요한 인자라고 할 수 있다[2, 20]. 통상 전통누룩은 소맥, 보리, 옥수수, 쌀, 귀리, 호밀과 같은 원료

전분질을 뿜은 다음, 물을 뿌린 후 성형하여 수일간 미생물을 배양하는 방식으로 제조된다[20]. 누룩 미생물로는 *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Endomyces* sp. 등의 곰팡이[2]와 *Sacchromyces* sp.의 효모[16] 및 *Leconostoc* sp., *Weissella* sp., *Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp. [3, 20] 등의 유산균이 알려져 있다. 따라서 전통누룩은 여러 종류의 미생물이 혼재하여 다양한 특성의 누룩을 제조할 수 있다는 장점은 있으나, 잡균 오염, 이상발효, 관능성 저하 및 균일 품질 유지의 어려움 등의 문제점을 가진다[2, 3, 20]. 따라서, 최근에는 전통누룩을 저온 살균하여 오염균을 제거하여 사용하거나[19], 증자 처리한 소맥, 보리, 쌀 등의 전분질에 선별된 단일 또는 수종의 미생물을 접종한 후 수일간 배양하여 특정 미생물이 대량 번식된 상태의 개량누룩을 주로 제조하여 사용하고 있다[16, 20].

본 연구팀에서는 전통주 및 주박의 항비만[16], 항산화[16], 항염증[21], 항혈전[7, 8], 항세균[7], 암세포 생육 억제[5], 미백 및 주름개선 활성[17, 18] 등의 생리활성을 보고한 바 있으며, 이러한 유용 생리활성들이 발효 원료 및 발효작용에

### \*Corresponding author

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

E-mail: hysohn@anu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

기인할 뿐만 아니라, 누룩 그 자체에 의해서도 나타나는 것으로 추측하고 있다[9, 16-18]. 실제 *Rhizopus oryzae* KSD-815 (*Rhizopus* sp. KFCC 1279)로 제조된 개량누룩(R4로 명명)의 경우, 누룩 추출물의 지방산 화합물의 암세포 생육억제 활성[11, 14], sterol 화합물의 암세포 전이억제활성[12], 추출물의 항비만 활성[15], 고혈압 및 암세포 전이 억제활성[13] 등이 알려져 있고, 최근 이화누룩의 경우에도 강력한 항혈전 활성을 확인한 바 있다[9]. 따라서 본 연구에서는 R4의 유용생리활성 발굴연구의 일환으로 R4 누룩의 항혈전 활성을 평가하고자 하였다. 실험에 사용한 R4 누룩은 2013년 상업적 시설(주곡순당, 성남, 한국)에서 대량 제조된 누룩으로, ethanol 추출물은 누룩 무게에 대해 10배의 95% ethanol (Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd. Korea)을 가한 후 상온에서 24시간, 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 filter paper (Whatsman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan)하여 조제하였다. 열수 추출물은 누룩 무게의 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간, 3회 반복 추출하였으며, 상기와 동일하게 감압농축 및 동결건조(Ilshin Lab Co. Ltd, Yangju, Korea)하여 조제하였다. 이후, 조제된 분말은 증류수에 현탁한 후, hexane, ethylacetate, butanol로 순차적 분획하였으며, 최종적으로 물 잔류물을 회수하였다. R4 누룩의 ethanol 및 열수추출의 수득율, 다양한 용매에 대한 분획 수득율 및 성분 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. Ethanol 추출물의 수득율은 6.2%이었으며, 순차적 분획시 ethanol 추출물의 20.9% 및 25.6%는 hexane 및 butanol 분획으로, 50.4%는 물 잔류물로 이행되었으며, ethylacetate 분획물은 ethanol 추출물의 2.6%를 차지하였다. 이러한 결과는 R4 누룩 100 g에 대해 ethylacetate 분획물 약 0.16 g을 얻게 됨을 의미한

다. 한편 열수 추출물의 수득율은 20.2%로 ethanol 추출에 비해 3.26배 높았으며, hexane, ethylacetate, butanol분획은 추출물의 0.1%, 0.8%, 9.1%로 미미하게 나타났으며, 대부분(90.9%)은 물 잔류물로 분획되었다. 따라서 열수 추출물의 대부분은 수용성 당류로 추측된다. 조제된 R4 누룩 ethanol 추출물의 총 폴리페놀(total polyphenol: TP) 및 총 플라보노이드(total flavonoid: TF) 함량을 측정된 결과(Table 1), 쌀을 주재료로 하는 이화누룩보다는 높은 함량의 27.3 mg/g의 TP 및 1.5 mg/g의 TF 함량을 나타내었으며[9], 분획물의 경우 ethylacetate 분획에서 344.6 mg/g의 매우 높은 TP 및 2.9 mg/g의 높은 TF 함량을 나타내었다. R4 누룩 열수 추출물은 ethanol 추출물보다 높은 16.5 mg/g의 TP 및 2.2 mg/g의 TF 함량을 나타내었으며(Table 1), 분획물의 경우 ethylacetate 분획에서 202.3 mg/g 및 15.3 mg/g의 가장 높은 TP 및 TF 함량을 나타내었다. 이때 TP 및 TF 함량은 기존보고[23, 25]와 동일하게 tannic acid 및 rutin을 표준시약으로 사용하였다.

R4 누룩 추출물 및 분획물의 항혈전 활성은 혈액응고 저해활성과 혈소판 응집저해 활성을 측정하여 평가하였다. 혈액응고 저해활성은 혈액 응고반응에서 중추적 역할을 수행하는 thrombin의 활성을 평가하는 thrombin time (TT), 외인성 응고계(II, V, VII 및 X 인자)의 응고 활성을 종합적으로 측정하는 prothrombin time (PT) 및 내인성 경로에 의한 혈액응고활성을 평가하는 activated partial thromboplastin time (aPTT)을 측정하였다[1, 8, 9]. 각각의 측정은 기존의 보고[8]와 동일하게 실시하였으며, 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 DMSO

**Table 1. Yields of extraction and subsequent organic solvent fractions of R4-nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815 and their total polyphenol and total flavonoid contents.**

Extraction Solvent	Extract/Fraction	Extraction/Fraction yield (%)	Content (mg/g)	
			Total polyphenol	Total flavonoid
Ethanol	Ethanol ex. <sup>1)</sup>	6.2	27.3±0.6 <sup>1)</sup>	1.5±0.0
	Hexane fr. <sup>2)</sup>	20.9	14.0±0.7	1.0±0.0
	Ethylacetate fr.	2.6	344.6±4.3	2.9±0.5
	Butanol fr.	25.6	37.1±1.8	3.2±0.1
	Water residue	50.4	20.6±0.1	0.1±0.1
Hot water	Hot water ex.	20.2	16.5±0.2	2.2±0.2
	Hexane fr.	0.1	3.5±0.1	0.9±0.6
	Ethylacetate fr.	0.8	202.3±4.5	15.3±2.2
	Butanol fr.	9.1	48.7±0.4	9.9±0.9
	Water residue	90.9	8.3±0.6	1.8±0.0

<sup>1)</sup>ex: extract, <sup>2)</sup>fr.: fraction. Data are presented as the mean±SD of three determinations.

의 실험 평균치의 비로 나타내었다[6-9]. 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. 혈액응고 저해활성 분석결과, 대조구에 사용된 aspirin (1.5 mg/ml)은 TT, PT, aPTT를 무첨가구에 비해 각각 1.7배 연장시켜 우수한 항혈전 효과를 확인하였다. 한편 R4 누룩의 ethanol 및 열수 추출물(5 mg/ml)은 TT에서 약한 연장활성이 나타났으나, PT 및 aPTT의 변화는 나타나지 않았다(Table 2). 그러나 ethanol 추출물의 순차적 분획물에서는 다양한 혈액응고 저해활성이 나타났으며, ethylacetate 분획에서는 대조구에 비해 각각 2.0배, 2.6배, 1.9배 연장된 TT, PT, aPTT를 나타내었으며, 농도의존적인 저해활성과 함께 7 mg/ml 농도에서는 대조구에 비해 각각 4.5배, 5.1배, 15배 연장된 TT, PT, aPTT를 나타내어 내인성 경로에 의한 혈액응고인자 저해가 매우 강력함을 확인하였다(Table 2). 열수 추출물의 경우 ethylacetate 분획에서 1.5배 연장된 TT를 나타내었으나, ethanol 추출물의 분획물보다 낮은 활성을 나타내었다. 이는 열수 추출 동안의 활성물질의 손실 및 실활에 기인하는 것으로 판단되며, 실제 ethanol 추출물의 ethylacetate 분획물을 100°C에서 1시간 열처리 이후 잔존 활성을 평가한 결과 열처리전과 비교하여 60% 정도의 aPTT 활성을 나타냄을 확인하였다. 상기의 결

과는, 항혈전 활성물질 회수를 위해서는 ethanol 추출이 적합하며, R4 누룩의 ethylacetate 분획은 기존 한방자원[6]보다 우수하며, 강력한 혈액응고인자 저해활성이 알려진 흑마늘의 ethylacetate 분획과 유사하였다[4].

R4 누룩의 항혈전 활성 평가를 위해 혈소판 응집 저해활성을 평가하였으며, 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 혈소판은 내피세포의 손상으로 노출된 collagen 등과 결합하여 혈전생성을 개시하는 중요한 세포[1]로, 혈소판의 비정상적인 응집은 혈전 생성을 촉진시켜 정상적인 혈액순환을 저해한다. 본 연구에서의 혈소판 응집저해 활성은 미세전극에 혈소판이 부착되어 응집됨에 따라 발생하는 전기 저항값의 변화를 측정하는 impedance 법을 사용하여 평가하였다[24]. 인간 농축 혈소판(platelet rich plasma: PRP)은 적십자로부터 공급받았으며 PRP의 전처리 및 수세과정은 기존의 보고[18]와 동일하게 하였으며, 최종 혈소판 농도가  $5 \times 10^8$ /ml이 되도록 조정된 후, Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, USA)를 사용해 37°C에서 측정하였으며, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l, suspending buffer 147.5  $\mu$ l, 시료 5  $\mu$ l가 포함된 반응 cuvette에 혈소판 50  $\mu$ l을 넣은 후 3분 동안 37°C로 가온 후 응집유도제로 collagen (1 mg/ml)을 2.5  $\mu$ l를 넣고 혈소판 응집을 측정하였다. 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 측정하였으며 amplitude, slope, area under를 측정하여 평가하였다[18]. 이때, amplitude (ohm)는 혈소판에 응집유도제

**Table 2. Effect of the ethanol and hot water extracts of R4-nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815 and their solvent fractions on blood coagulation.**

Extraction Solvent	Chemicals/Extract /Fraction	Concentration (mg/ml)	Anti-thrombosis activity <sup>1)</sup>		
			TT	PT	aPTT
-	DMSO	-	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
-	Aspirin	1.5	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>e</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	1.7 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>
Ethanol	Ethanol ex. <sup>2)</sup>	5.0	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	Hexane fr. <sup>3)</sup>	5.0	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
	Ethylacetate fr.	5.0	2.0 $\pm$ 0.0 <sup>f</sup>	2.6 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	1.9 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>
		6.0	3.0 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.2
		7.0	4.5 $\pm$ 0.2	5.1 $\pm$ 0.1	>15.0
	Butanol fr.	5.0	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	Water residue	5.0	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
Hot water	Hot water ex.	5.0	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
	Hexane fr.	5.0	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
	Ethylacetate fr.	5.0	1.5 $\pm$ 0.0 <sup>d</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
	Butanol fr.	5.0	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
	Water residue	5.0	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>

<sup>1)</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 26.7 sec, 18.8 sec and 40.1 sec, respectively. <sup>2)</sup>ex: extract, <sup>3)</sup>fr.: fraction. Different superscript letters (a-f) within a column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 3. Platelet aggregation activities of the ethanol and hot water extract and their solvent fractions of R4-nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815.**

Extraction Solvent	Chemicals/Extract /Fraction	Amplitude (Ω)	Slope (Ω/min)	Lag time (sec)	Area under	PAR <sup>1)</sup> (%)
-	DMSO	19	2	30	122.7	100.0
-	Aspirin (0.5 mg/ml)	8	1	57	42.2	34.4
-	Aspirin (0.25 mg/ml)	16	2	35	80.9	65.9
Ethanol	Ethanol ex. <sup>2)</sup>	23	5	9	175.5	143.1
	Hexane fr. <sup>3)</sup>	25	11	2	241.5	196.8
	Ethylacetate fr.	23	4	4	163.7	133.4
	Butanol fr.	18	2	13	111.0	90.5
	Water residue	23	3	10	153.2	124.9
Hot water	Hot water ex.	24	3	22	169.1	137.8
	Hexane fr.	27	5	10	235.0	191.5
	Ethylacetate fr.	14	2	34	91.9	74.9
	Butanol fr.	17	2	33	106.7	86.9
	Water residue	26	4	22	185.7	151.3

<sup>1)</sup>PAR: Platelet Aggregation Ratio, <sup>2)</sup>ex: extract, <sup>3)</sup>fr.: fraction.

The concentrations of samples of R4-nuruk used were 0.25 mg/ml, respectively. 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.

를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집정도를 나타내며, slope는 응집유도제를 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 나타내며, area under는 전체적인 혈소판 응집 정도를 표시하는 것으로 전기저항 증가에 따른 slope 곡선의 하강면적을 나타낸다[18]. R4 누룩의 혈소판 응집 저해 활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구의 상대적인 area under 값의 비를 백분율로 나타내었다. 대조구로 사용된 혈소판 응집저해제인 아스피린은 농도의존적인 혈소판 응집저해 활성을 나타내었으며, 0.25 mg/ml 농도에서 무첨가구에 비해 65.9%의 응집율을 나타내었다(Table 3). R4 누룩의 ethanol 추출물 및 분획물(0.25 mg/ml)은, butanol 분획물을 제외한 모든 시료에서 유의적인 혈소판 응집저해 활성을 나타내지 않았으며, 오히려 응집 촉진에 나타났다. 한편 R4 누룩의 열수 추출물 및 분획물 중에서는 ethylacetate 및 butanol 분획에서 혈소판 응집 저해활성을 나타내었다. 따라서 R4 누룩은 다양한 성분의 혈액응고효소, 혈액응고인자 및 혈소판 응집 저해활성물질을 포함하고 있음을 확인하였다. 한편 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가하였으며, 인간 적혈구(4%) 100 μl를 96-well microplate에 가하고 다양한 농도의 시료용액 100 μl를 가한 다음 37°C에서 30분간 반응시켰으며, 이후, 반응액을 10분간 원심분리(1,500 rpm)하여 상등액 100 μl를 새로운 microtiter plate로 옮긴 후 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하여 평가하였

**Table 4. Hemolytic activities of the ethanol and hot water extract and their solvent fractions of R4-nuruk made from *Rhizopus oryzae* KSD-815 against human red blood cell.**

Samples/Chemicals (mg/ml)	Hemolysis against human RBC (%)	
DMSO	0.0±0.6	
Triton X-100 (0.1%)	99.9±0.5	
Ethanol extract (0.5)	Extract	23.0±0.4
	Hexane fr. <sup>1)</sup>	91.4±0.5
	Ethylacetate fr.	81.8±0.2
	Butanol fr.	-3.0±2.2
	Water residue	-0.7±0.5
Hot-water extract (0.5)	Extract	2.3±0.8
	Hexane fr.	1.4±0.7
	Ethylacetate fr.	0.8±1.0
	Butanol fr.	5.5±0.7
	Water residue	0.8±0.1

<sup>1)</sup>fr: fraction.

다[10]. 그 결과, ethanol 추출물(0.5 mg/ml)에서 23% 이상의 용혈활성이 나타났으며, 특히 hexane 및 ethylacetate 분획물에서는 용혈활성이 강하게 나타났다(Table 4). 본 연구 결과는 R4 열수 추출물의 ethylacetate 분획은 향후 항응고

및 혈소판 응집저해 개발의 유용자원으로 이용가능함을 제시하고 있다. 향후 R4 누룩으로부터 활성물질의 정제 및 이의 항혈전 기작 연구가 필요하다고 판단된다.

## 요약

누룩은 전 세계적으로도 독특한 우리만의 발효제로, 전분 당화 및 발효미생물의 접종원으로 이용된다. *Rhizopus oryzae* KSD-815로 제조된 개량누룩(R4로 명명)은 발효제 특성 이외에 암세포 생육억제, 항비만 활성 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 R4 누룩의 열수 및 ethanol 추출물과 이들의 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 항혈전 활성을 평가한 결과, ethylacetate 분획에서 우수한 항응고 활성을 확인하였으며, 열수 추출물의 ethylacetate 및 butanol 분획은 인간 적혈구 용혈활성을 나타내지 않으면서 혈소판 응집저해 활성을 나타내었다. 본 연구결과는 R4 누룩이 항응고 및 혈소판 응집저해 개발의 유용자원으로 이용 가능함을 제시하고 있다.

## 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

- 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.
- Huh CK, Kim SM, Kim YD. 2014. Comparison for enzymatic activity of nuruk and quality properties of yakju by different fungi. *Korean J. Food Preserv.* **21**: 573-580.
- Jang D, Park S, Lee H, Pyo S, Lee HS. 2013. Isolation of alcohol-tolerant lactic acid bacteria *Pediococcus acidolactici* K3 and S1 and their physiological characterization. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 442-448.
- Jung IC, Sohn HY. 2014. Antioxidation, antimicrobial and anti-thrombosis activities of aged black garlic (*Allium sativum* L.). *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 285-292.
- Kang HT, Lee SH, Kim SY, Kim MS, Shin WC, Sohn HY, et al. 2014. Anti-proliferative activities of solvent fractions of lees extract in human colorectal HCT116 cells. *J. Life Sci.* **24**: 967-972.
- 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**: 113-139.
- Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY. 2014. Anti-microbial and anti-thrombosis activities of lees of sweet potato soju. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 258-266.
- Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY. 2014. Evaluation of in-vitro antithrombosis activity of lees of Korean traditional wine. *J. Life Sci.* **24**: 865-872.
- Kim MS, Lee YS, Kim JS, Shin WC, Sohn HY. 2014. In-vitro antithrombosis activity of Ehwa nuruk. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 302-306.
- Kim MS, Sohn HY. 2014. Anti-thrombosis activity of the aerial parts of *Aruncus dioicus* var *kamtschaticus*. *J. Life Sci.* **24**: 515-521.
- Kwak HY, Lee SJ, Lee DY, Jung L, Bae NH, Hong SY, et al. 2008. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of lipids from the nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**: 142-147.
- Lee DY, Lee SJ, Kwak HY, Jung L, Heo J, Hong SY, et al. 2009. Sterols isolated from Nuruk (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 1328-1332.
- Lee SJ, Bae HJ, Ryu JY, Lee DY, Kim GW, Baek NI, et al. 2009. Extracts from *Rhizopus oryzae* KSD-815 of Korean traditional nuruk confer the potential to inhibit hypertension, platelet aggregation, and cancer metastasis in vitro. *Food Sci. Biotechnol.* **18**: 1423-1429.
- Lee SJ, Hong SY, Kim GW. 2010.  $\gamma$ -Linolenic acid methyl ester from *Rhizopus oryzae* KSD-815 isolated from nuruk induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 752-760.
- Lee SJ, Kim GW. 2010. Hypolipidemic effect of hexane fraction from *Rhizopus oryzae* KSD-815 through peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 761-765.
- Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park SY, Shin WC, Park CS, et al. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.* **43**: 206-212.
- Lee SJ, Kwon YY, Cho SW, Kwon HS, Shin WC. 2013. Effect of ehwa makgeolli containing oriental herbs on skin whitening and wrinkles. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 550-555.
- Lee SM, Lee SJ, Kwon YY, Baek SH, Kim JS, Sohn HY, et al. 2014. Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **43**: 1695-1700.
- Park JH, Choi JH, Yeo SH, Teong ST, Cho HA, Kang JE, et al. 2013. A study on the quality characteristics of makgeolli using heat treatment of traditional Korean nuruk extract. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **23**: 620-628.
- Park JH, Chung CH. 2014. Characteristics of takju (a cloudy Korean rice wine) prepared with nuruk (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in nuruk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **46**: 153-164.
- Park MJ, Kang HT, Kim MS, Shin WC, Sohn HY, Kim JS. 2014. Anti-inflammatory effects of extracts and their solvent

fractions of rice wine lees. *J. Life Sci.* **24**: 843-850.

22. Shin MO, Kang DY, Kim MH, Bae SJ. 2008. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of makgeol fractions in various cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 288-293.
23. 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.
24. 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.
25. 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.