

## Anti-microbial, Anti-oxidant, and Anti-thrombosis Activities of the Lees of Bokbunja Wine (*Rubus coreanus* Miquel)

Mi-Sun Kim<sup>1</sup>, Dong-Kyoon Kang<sup>2</sup>, Woo-Chang Shin<sup>3</sup> and Ho-Yong Sohn<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>GyeongSangBukDo Agricultural Research & Extension Services, Daegu 702-708, Korea

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

Received July 8, 2015 / Revised July 9, 2015 / Accepted July 9, 2015

The immature fruit of *Rubus coreanus* Miquel (bokbunja in Korean) is mainly consumed as a fruit wine due to its sour taste and low sugar content. The lees (LBW) remaining after the production of bokbunja wine are discarded as they have no specific usage. The aim of this study was to develop high-value-added biomaterials for functional foods and beauty/health products by investigating the anti-microbial, anti-oxidant, and anti-thrombosis activities of LBW using ethanol and hot water extracts and their subsequent organic solvent fractions. The ethyl acetate (EA) fraction of LBW extracts has a high polyphenol content (413 - 459 mg/g), and showed strong anti-microbial activity against gram-positive bacteria. The EA fraction also showed excellent radical-scavenging activity against DPPH anion, ABTS cation, and nitrite, with strong reducing power. The polyphenol-enriched EA fraction strongly inhibited thrombin, prothrombin, and blood coagulation factors. The butanol fraction showed a specific inhibition of coagulation factors, as measured in activated partial thromboplastin time assay, which is linked to intrinsic blood coagulation. The butanol fraction also showed strong inhibition of platelet aggregation, at levels comparable to aspirin. The residue of the hot-water extract, which is produced by sequential solvent fractionation of the LBW extract, showed superior inhibition against platelet aggregation when compared to aspirin. Our results suggest that the LBW, which are currently discarded, are a promising source of novel functional foods and beauty/health products.

**Key words** : Anti-microbial, anti-oxidant, anti-thrombosis, lees of bokbunja, *Rubus coreanus* Miquel

### 서 론

복분자 딸기(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과의 낙엽 활엽성 관목으로 복분, 오천자, 고무딸기, 곰의딸, 오폐자 등으로 부르며, 특히 미숙과를 복분자라고 하며, 원산지는 중국으로 알려져 있다. 우리나라에서는 1960년대 북미산 품종(black raspberry)이 처음 도입된 후, 전북 고창, 정읍을 중심으로 대량 생산되고 있으며[19], 최근에는 전남 장성, 강원 횡성 및 경북 문경 및 안동에서도 생산량이 증가되고 있는 실정이다. 복분자는 그 자체로 우수한 식용가치를 가지고 있어 추출 음료 및 차 등의 식용으로 이용되고 있으나, 당도가 낮고 신맛이 강해 생과보다는 설탕을 첨가한 과실주, 초콜릿 및 식빵 등의 가공식품으로 더욱 많이 이용되고 있다. 특히 복분자 과실주는 국내에서만 연간 1,000억원 이상의 시장을 형성하고 있다

[22]. 또한 복분자는 한방에서는 눈을 밝게 하며, 이뇨작용 및 정력감퇴 예방에 효능이 우수하다고 알려져 있다[16]. 실제 복분자는 비타민, 미네랄 성분, 수용성 anthocyanin 색소들, 페놀성 화합물, 가수분해성 탄닌 등을 다량 함유되어 있어[17], superoxide 제거활성[18], 항균 활성[1], 항바이러스 활성[5] 암 세포 성장 억제활성[20], 통증완화[4], 항염증 활성[31, 32] 및 항고혈압 활성[15] 등이 보고되어 있다. 최근에는 국내 다양한 지역에서 대량 재배되면서, 재배지별 복분자 및 복분자주의 유기산 함량 및 색차 등의 품질특성에 대한 연구도 진행되고 있다[18, 19],

한편 복분자주는 이물질을 제거한 수세 복분자를 파쇄한 후, 이에 과당과 효모를 가해 발효를 진행하고, 이후 발효가 끝난 숙성 술덧에 주정을 추가한 후, 유용성분을 추출하고, 이후 술덧을 압착하여 주박을 제거하여 제조한다. 복분자주의 제조는 씨에 포함된 탄닌 성분에 의한 떫은 맛 생성, 발효관리 미숙으로 인한 색상저하 및 불완전 발효시의 미숙취 발생 등의 어려움으로 인해 품질관리에 어려움이 있으며[3], 현재는 복분자주에 적합한 발효균주 선별에 연구가 집중되고 있다 [22, 30], 복분자에 대한 많은 연구에도 불구하고, 현재까지 복분자주의 생리활성으로는 항당뇨 활성[26], 항산화 활성[22] 등이 일부 보고되어 있다. 또한 복분자주 주박 역시 기존의

#### \*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.

보고된 탁주 주박과 유사하게 항산화 활성[11, 12], 미백활성[6], 항주름 활성[21, 28] 및 항염증 활성[24]이 우수할 것으로 예상되나, 현재까지 복분자주 주박에 대한 효능 평가연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 복분자주 주박의 효율적인 재활용을 위해, 상업적 시설에서 생산된 복분자주의 주박으로부터 ethanol 추출물 및 열수 추출물을 조제하고, 이로부터 순차적 유기용매 분획물을 조제하여 항균 활성, 항산화 활성, 항혈전 활성, 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 그 결과 복분자주 주박이 건강식품 및 향장제품 소재로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 복분자 주박은 2013년 (주)국순당의 상업적 시설에서 생산된 복분자주의 주박을 공급받아 사용하였으며, 복분자주 주박의 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 이들로부터 *n*-hexane, ethylacetate (EA) 및 butanol을 이용한 순차적 유기용매 분획물 제조는 기존의 보고된 방법과 동일한 방법을 사용하였다[7, 9]. 제조된 10종의 복분자주 주박의 다양한 추출물 및 분획물의 분말시료들은 DMSO에 적당한 농도로 녹여, *in-vitro* 항균, 항산화, 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[9]. 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-W7-1~5, KSD-E7-1~5).

### 항균 활성

복분자주 주박의 항균 활성은 기존의 보고된 방법과 동일하게, 항세균 활성의 경우 Nutrient agar (Difco Co., USA) 배지를, 항진균 활성의 경우 Sabouraud dextrose (Difco Co. USA) 배지를 이용하여 disc-diffusion법으로 평가하였다[9]. 사용균주 중, 그람 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* KACC 10550, *Bacillus subtilis* KCTC 1924를, 그람 음성세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1682, *Pseudomonas aeruginosa* KACC 10186, *Proteus vulgaris* KCTC 2433, *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, 진균으로는 *Candida albicans* KCTC 1940 및 *Saccharomyces cerevisiae* IF0 0233를 사용하였다. 각각의 조제된 배지(90×15 mm, Green Cross Co., Ltd. Korea)에 실험균주(O.D.<sub>600</sub> 0.1)를 100 µl 도말하고, 이후 각각의 시료 5 µl를 멸균

disc-paper (지름 6.5 mm, Whatman No.2)에 가하여 37°C 및 30°C에서 24시간 동안 배양 후, 생육저지환의 크기를 측정하여 항균활성을 평가하였다[9]. 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 각각 1 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

### 항산화 활성

복분자주 주박 시료의 항산화 활성은 기존의 보고[7-10]한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) anion scavenging activity [DSA], ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] cation scavenging activity [ASA] 및 환원력 측정으로 평가하였으며, 최종 항산화 활성의 비교는 RC<sub>50</sub> (표준조건에서 활성 radical을 50% 제거하는 데 소용되는 시료의 양)으로 나타내었다. 이때 활성 평가의 대조구로는 vitamin C (Sigma Co.)를, 용매 대조구로는 DMSO를 사용하였다. 한편 nitrite scavenging activity [NSA]의 경우 아질산염 용액(1 mM)에 시료용액을 가하고 여기에 0.1 N HCl을 가해 pH 1.2로 조정 한 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 계산하였으며[10], 소거 활성의 비교는 RC<sub>50</sub>으로 나타내었다.

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

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

B: 1 mM nitrite 용액의 흡광도, C: 시료의 흡광도.

### 항혈전 활성

항혈전 활성 평가의 일환으로 혈액응고 저해활성을 측정하였으며, 혈액응고 저해는 내인성 혈전 생성과 관련된 activated partial thromboplastin time (aPTT)과 외인성 혈전 생성과 관련된 prothrombin time (PT)을 측정하여 평가하였으며, 혈액 응고에서 중추적 역할을 수행하는 thrombin에 대한 저해는 시료의 thrombin time (TT)을 측정하여 평가하였다. 각각의 상세한 측정방법은 기존의 보고와 동일하게 하였다[8, 10]. 항혈전 활성은 시료 첨가시에 혈액 응고인자. prothrombin 및 thrombin 저해에 따른 혈액응고 시간 증가를 3회 이상 각각 측정 한 후, 시료 첨가시의 aPTT, PT 및 TT 실험의 평균치를 각각의 무첨가구의 평균치의 비로 나타내었다. 즉 2배 증가된 실험결과는 복분자주 주박시료 첨가로 인해 혈액응고시간이 2배 연장되었음을 의미한다[10]. 이때 시료 대조군으로는 aspirin (Sigma Co.)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다.

복분자주 주박의 항혈전 활성 평가를 위해, 혈소판 응집저해 활성을 측정하였으며, 기존의 보고한 방법과 동일한 방법

으로 평가하였다[8-10]. 혈소판 응집저해는 Whole Blood Aggregometer (Chrono-log, PA, USA)를 이용하여 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[10]와 동일하게 하였으며, 응집반응은 collagen 첨가 후 12분간 amplitude, slope, area under 를 측정하여 평가하였다[10, 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. 시료의 혈소판 응집활성은 시료 대신 DMSO를 첨가한 대조구와의 상대적인 area under값의 비를 백분율로 나타내었다[8, 10].

**인간 적혈구 용혈 활성 평가**

복분자주 주박 추출물 및 이들의 순차적 분획물의 인간 적혈구에 대한 용혈 활성은 기존의 방법[10]과 동일하게 평가하였다. 먼저 PBS로 3회 수세한 인간 적혈구 100 µl (4%)를 96-well microplate에 가하고 복분자주 주박 추출물 및 분획물을 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 측정하였다[10]. 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**

총 폴리페놀 (Total polyphenol) 및 총 플라보노이드(Total flavonoid) 함량은 기존의 보고된 방법[8, 25]과 동일하게 측정하였으며, 표준물질로는 각각 tannic acid (Sigma Co.)와 rutin (Sigma Co.)을 사용하였다. 총당 정량의 경우에는 phenol-sulfuric acid법[29]을, 환원당 정량의 경우에는 DNS법[23]을 사용하였다. 표준물질로는 각각 sucrose (Duksan Co., Korea)와 glucose (Duksan Co., Korea)를 사용하였다. 각각의 분석결과는 3회 반복한 실험의 평균과 편차로 나타내었다.

**통계분석**

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

**결과 및 고찰**

**복분자주 주박의 이화학적 특성 및 추출물**

복분자주 주박은 특유의 검붉은 색깔을 나타내었으며, brix 2.0, pH 3.96, 수분함량 51.0%를 나타내어 약산성의 건조 케이크 상태이며, 잔존 ethanol 함량은 0.1% 미만이었다. 이는 국내 생산되는 다른 탁주 및 약주 주박의 평균 알코올 함량이 1.0~1.8%임을 고려하면[8, 10], 복분자주 주박은 매우 낮은 알코올을 함유하고 있음을 의미한다. 한편 복분자주 주박의 ethanol 추출 수율은 3.70%로 열수 추출 수율보다 2.43배 높았으며 (Table 1), 추출물의 유기용매 순차적 분획결과 대부분이 butanol 분획 및 물 잔류물로 이행되었다. 반면 열수 추출물의 hex-

Table 1. Yields and compositions of the extraction and organic solvent fractions of lees of the fruit wine from *Rubus coreanus* Miquel

Extract	Fractions	Yield (%)	Content (mg/g)			
			Total flavonoid	Total polyphenol	Total sugar	Reducing sugar
Hot water extract	Extract	1.52	14.80±1.38 <sup>a</sup>	195.60±1.34 <sup>c</sup>	279.41±3.95 <sup>b</sup>	159.41±0.98 <sup>e</sup>
	n-hexane Fr. <sup>1)</sup>	0.24	0.38±0.02 <sup>a</sup>	1.99±0.06 <sup>a</sup>	56.21±15.5 <sup>a</sup>	12.11±0.05 <sup>a</sup>
	ethylacetate Fr.	2.54	21.73±0.69 <sup>a</sup>	413.05±12.09 <sup>e</sup>	220.57±60.08 <sup>b</sup>	84.22±0.59 <sup>c</sup>
	n-butanol Fr.	46.66	17.53±0.04 <sup>a</sup>	223.14±6.71 <sup>d</sup>	314.91±148.94 <sup>b</sup>	135.64±3.93 <sup>d</sup>
	water residue	54.29	7.38±0.05 <sup>a</sup>	64.47±0.67 <sup>b</sup>	338.25±38.08 <sup>b</sup>	63.44±0.49 <sup>b</sup>
Ethanol extract	Extract	3.70	6.80±0.55 <sup>a</sup>	49.00±0.81 <sup>b</sup>	156.54±36.11 <sup>a</sup>	7.78±0.01 <sup>a</sup>
	n-hexane Fr.	15.14	6.21±0.01 <sup>a</sup>	13.20±0.08 <sup>a</sup>	147.96±43.72 <sup>a</sup>	8.57±0.08 <sup>a</sup>
	ethylacetate Fr.	8.73	41.44±1.24 <sup>c</sup>	459.10±3.36 <sup>e</sup>	195.83±68.55 <sup>a</sup>	75.39±5.93 <sup>b</sup>
	n-butanol Fr.	44.91	42.02±2.66 <sup>c</sup>	431.99±10.81 <sup>d</sup>	259.86±27.08 <sup>b</sup>	104.38±4.13 <sup>c</sup>
	water residue	33.01	15.38±4.42 <sup>b</sup>	174.72±1.34 <sup>c</sup>	530.94±35.26 <sup>c</sup>	159.43±0.00 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>Fr.: fraction, <sup>2)</sup>Values are means ±SD of triplicate determinations.

Different superscript letters (a~e) within a column differ significantly (p<0.05).

Table 2. Antimicrobial activity of the extracts and their organic solvent fractions of lees of the fruit wine from *Rubus coreanus* Miquel against pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi

Samples/ Chemicals	Extract/Fr. <sup>1)</sup>	Growth inhibition zone (mm)									
		Gram positive					Gram negative			Fungi	
		SA <sup>2)</sup>	SE	LM	BS	EC	PA	PV	ST	CA	SC
Hot water extract	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n-hexane Fr. <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ethylacetate Fr.	9.5	12.0	10.0	130.	-	-	14.0	-	-	-
	n-butanol Fr.	8.0	10.0	-	11.0	-	-	11.0	-	-	-
	water residue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol extract	Extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n-hexane Fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ethylacetate Fr.	9.5	16.0	16.0	100.	-	-	-	-	-	-
	n-butanol Fr.	8.0	9.0	10.0	8.5	-	-	-	-	-	-
	water residue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicillin	-	18.0	18.0	32.0	25.0	9.0	10.0	26.0	11.0	-	-
Miconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19.0	31.0

<sup>1)</sup>Fr.: fraction, <sup>2)</sup>SA: *Staphylococcus aureus*, SE: *Staphylococcus epidermidis*, LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella typhimurium*, CA: *Candida albicans*, SC: *Saccharomyces cerevisiae*, <sup>3)</sup>-: No inhibition.

The concentrations of the extract/fractions and antibiotics used were 500 µg/disc and 1 µg/disc, respectively. The growth inhibition zone expressed was included size of disc-paper (6.5 mm of diameter). The data represent a classical result of three independent determinations.

ane 분획은 0.24%이었으나 ethanol추출물의 hexane 분획은 15.14%를 차지하여 대조를 보였다. 주박 열수 추출물의 polyphenol함량은 195.60 mg/g으로 ethanol 추출물보다 4.0배 높았으며, flavonoid 함량도 열수 추출물이 ethanol추출물보다 2.17배 높게 나타났다. 이는 기존의 보고된 탁주 및 약주의 주박보다 4.5~10배 높은 함량[8, 10]으로 복분자 주박의 우수성을 알 수 있다. 각각 분획물의 polyphenol 및 flavonoid함량 분석 결과 열수 추출물에서는 EA 분획이, ethanol 추출물에서는 EA 분획 및 butanol 분획에서 431~459 mg/g의 높은 함량을 나타내었다. 총당의 경우 ethanol 및 열수 추출물 모두에서 물 잔류물이 가장 높은 함량을 나타내었으나, 환원당 함량의 경우에는 열수 추출물은 butanol 분획에서, ethanol 추출물은 물 잔류물에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서 복분자주 주박의 ethanol 추출물과 열수 추출물 및 이의 분획물은 서로 다른 다양한 성분을 포함하고 있으며, 유용 생리활성은 추출물의 EA 분획 및 butanol 분획물에서 우수하리라 예상되었다.

**복분자주 주박의 항균 활성**

복분자주 주박의 열수 추출물, ethanol 추출물 및 이들의 순차적 유기용매 분획물을 대상으로 항균 활성을 평가하였다. 먼저 대조구로 사용된 ampicillin 및 miconazole은 우수한 항세균 및 항진균 활성을 나타내었으며, 복분자주 주박 추출물은 전체적으로 항세균 및 항진균 활성을 나타내지 않았다 (Table 2). 그러나 열수 및 ethanol 추출물의 EA 분획 및 butanol 분획은 그람양성균에 대해 강한 항세균 활성을 나타내었

으며, 열수 추출물의 상기 분획물의 경우 그람 음성세균인 *Proteus vulgaris* 에 대한 항균력을 나타내었다. 따라서 복분자 주박의 EA 분획 및 butanol 분획은 새로운 항균 소재 개발에 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

**복분자주 주박의 항산화 활성**

복분자주 주박의 항산화 활성은 활성 radical 소거능을 측정 한 후 이를 RC<sub>50</sub>으로 계산하여 나타내었다(Table 3). 먼저 대조구로 사용된 vitamin C는 DPPH 음이온, ABTS 양이온, nitrite

Table 3. Radical scavenging activities (RC<sub>50</sub>s) of the extracts and their organic solvent fractions of lees of the fruit wine from *Rubus coreanus* Miquel

Samples/ Chemicals	Extract./Fr. <sup>1)</sup>	RC <sub>50</sub> (µg/ml)		
		DPPH	ABTS	Nitrite
Hot water extract	Extract	158.0	80.9	87.6
	n-hexane Fr. <sup>1)</sup>	>500	292.2	>100
	ethylacetate Fr.	28.1	39.5	35.3
	n-butanol Fr.	103.2	56.5	94.3
	water residue	>500	142.5	>100
Ethanol extract	Extract	>500	>500	79.5
	n-hexane Fr.	>500	>500	86.1
	ethylacetate Fr.	24.6	12.4	24.5
	n-butanol Fr.	58.5	10.9	25.3
	water residue	156.2	58.5	93.1
Vitamin C	-	13.9	4.0	16.2

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

에 대해 각각 13.9, 4.0 및 16.2  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{RC}_{50}$ 을 나타내어 우수한 항산화력을 확인하였다. 복분자주 주박의 경우, 열수 추출물이 ethanol 추출물보다 우수한 DPPH 음이온 및 ABTS 양이온 소거능을 나타내었으나, nitrite 소거능은 유사하였다. 반면 분획물의 경우 ethanol 추출물의 EA분획 및 butanol 분획, 물 잔류물은 매우 우수한 radical 소거능을 나타내었으며, 특히 EA분획의 DPPH 음이온, ABTS 양이온, nitrite 소거능은 각각 24.6, 12.4 및 24.5  $\mu\text{g/ml}$ 의  $\text{RC}_{50}$ 을 나타내어 vitamin C에 필적하는 항산화능을 나타내었다. 한편 환원력 측정의 경우, ethanol 추출물 및 열수 추출물 모두에서 양호한 환원력이 나타났

으며, 모두 EA 분획에서 가장 우수한 환원력이 나타났다(Fig. 1). 특히 ethanol 추출물의 경우 EA 분획 및 butanol 분획에서는 거의 유사한 환원력을 나타내었다. 따라서 복분자 주박은 내열성이 강한 다양한 항산화 활성 물질을 포함하고 있음을 확인하였으며, 복분자 주박의 EA 분획은 건강식품 및 향장소재로 개발 가능하다고 판단된다.

**복분자주 주박의 혈액응고 저해활성**

복분자주 주박의 항혈전 활성 평가를 위해 혈액응고 저해활성을 평가하였다. 먼저 대조군으로 사용된 항혈전제 aspirin (1.5

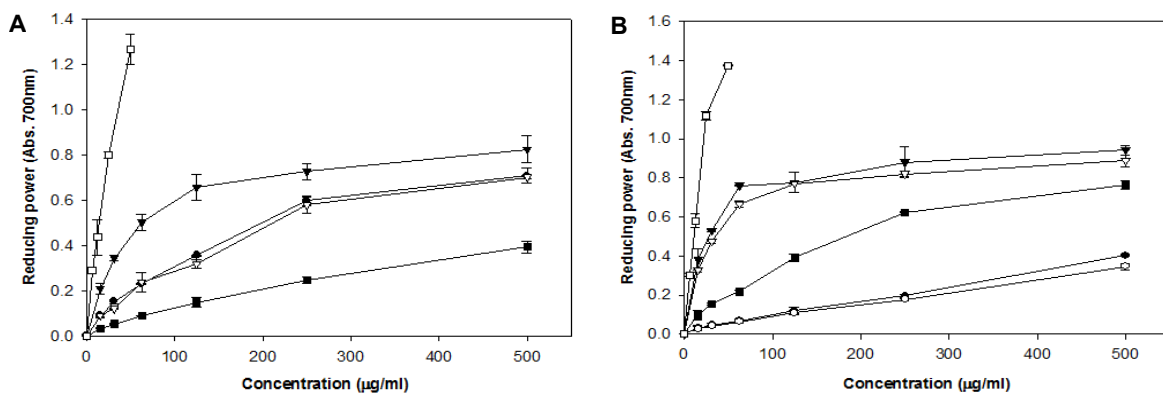


Fig. 1. Reducing power of the extracts and their organic solvent fractions of lees of the fruit wine from *Rubus coreanus* Miquel. A: hot water extract and its fraction, B: ethanol extract and its fraction. Symbols: Vitamin C ( $\square$ ), Extract ( $\bullet$ ), hexane fraction ( $\circ$ ), ethylacetate fraction ( $\blacktriangledown$ ), butanol fraction ( $\nabla$ ), and water residue ( $\blacksquare$ ).

Table 4. Anti-coagulation activity of the extracts and their organic solvent fractions of lees of the fruit wine from *Rubus coreanus* Miquel

Samples/ Chemicals	Extract/Fr. <sup>1)</sup>	Concentration (mg/ml)	Anti-thrombosis activity (x control)		
			TT	PT	aPTT
DMSO	-	-	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
Aspirin	-	1.5	1.9±0.1 <sup>d</sup>	1.7±0.1 <sup>c</sup>	1.9±0.1 <sup>c</sup>
Ethanol extract	Extract	5	1.2±0.0 <sup>b</sup>	1.2±0.1 <sup>ab</sup>	1.3±0.0 <sup>b</sup>
	n-hexane Fr.	5	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	ethylacetate Fr.	5	>15.0 <sup>f</sup>	>15.0 <sup>e</sup>	>15.0 <sup>e</sup>
		2.5	1.1±0.2 <sup>ab</sup>	1.8±0.1 <sup>cd</sup>	2.4±0.1 <sup>d</sup>
	n-butanol Fr.	1.25	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.2±0.2 <sup>ab</sup>	1.2±0.1 <sup>b</sup>
		5	1.3±0.1 <sup>bc</sup>	1.4±0.0 <sup>bc</sup>	>15.0 <sup>e</sup>
	water residue	2.5	1.1±0.0 <sup>ab</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
		5	1.3±0.0 <sup>bc</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	0.9±0.0 <sup>a</sup>
Hot water extract	Extract	5	1.4±0.0 <sup>c</sup>	1.2±0.0 <sup>ab</sup>	2.0±0.2 <sup>c</sup>
	n-hexane Fr.	2.5	1.1±0.0 <sup>ab</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>a</sup>
		5	1.2±0.0 <sup>b</sup>	1.3±0.0 <sup>b</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	ethylacetate Fr.	6	>15.0 <sup>f</sup>	>15.0 <sup>e</sup>	>15.0 <sup>e</sup>
		5	4.2±0.1 <sup>e</sup>	>15.0 <sup>e</sup>	>15.0 <sup>e</sup>
	n-butanol Fr.	2.5	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.5±0.0 <sup>c</sup>	1.9±0.1 <sup>c</sup>
		1.25	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	1.3±0.1 <sup>b</sup>
	water residue	5	1.8±0.1 <sup>d</sup>	1.6±0.1 <sup>c</sup>	>15.0
2.5		1.3±0.1 <sup>bc</sup>	1.1±0.1 <sup>a</sup>	0.9±0.0 <sup>a</sup>	
water residue	5	1.2±0.0 <sup>b</sup>	1.1±0.0 <sup>a</sup>	1.2±0.0 <sup>b</sup>	

Different superscript letters (a~f) within a column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 5. Platelet aggregation activity of the ethanol and hot water extract and their solvent fractions of the lees of fruit wine (*Rubus coreanus* Miquel)

Chemicals/Samples (mg/ml)		Amplitude ( $\Omega$ )	Slope ( $\Omega$ /min)	Lag time (sec)	Area under	PAA <sup>1</sup> (%)
	DMSO	20	2	39	118.0	100.0
	Aspirin (0.25)	11	1	38	68.9	58.4
	Aspirin (0.50)	7	1	58	45.7	38.7
Ethanol extract	Extract	26	6	2	238.5	202.1
	n-hexane Fr. <sup>2)</sup>	19	3	2	139.8	118.5
	ethylacetate Fr.	21	3	13	145.2	123.1
	n-butanol Fr.	8	2	31	64.4	54.6
	water residue.	6	1	44	46.4	39.3
Hot water extract	Extract	12	2	34	86.2	73.1
	n-hexane Fr.	25	4	11	205.8	174.4
	ethylacetate Fr.	26	4	8	181.1	153.5
	n-butanol Fr.	8	2	29	62.4	52.9
	water residue.	25	2	30	158.8	134.6

<sup>1</sup>PAA: Platelet Aggregation Activity, <sup>2</sup>Fr: fraction.

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.

mg/ml)은 무처리구에 비해 TT는 1.9배, PT는 1.7배, aPTT는 1.9배 연장시켜 우수한 혈액응고 저해활성을 나타내었다 (Table 4). 복분자주 주박의 ethanol 추출물(5 mg/ml)의 경우 미약한 저해활성을 나타내었으나, 추출물의 EA분획(5 mg/ml)은 TT, PT, aPTT 모두에서 혈액응고 시간을 15배 이상 연장시켜 강력한 저해활성을 나타내었다. 또한 특이하게 butanol 분획에서는 내인성 혈전생성에 관련된 aPTT만을 15배 이상 연장시켜 butanol 분획은 향후 내인성 혈전 생성 억제제 개발 및 관련 기작연구에 중요하게 이용되리라 판단된다. 이러한 EA의 강력한 혈액응고 저해 활성과 butanol 분획의 특이적 aPTT 연장활성은 열수 추출물과 이의 분획물에서 동일하게 확인되었다. 현재 ethanol 추출물의 EA 분획물을 대상으로 활성물질의 정제 및 특성분석이 진행 중에 있다.

#### 복분자주 주박 시료의 혈소판 응집저해 활성 및 적혈구 용혈 활성

혈전 생성반응의 개시 및 강화에 필수적인 혈소판은 collagen, 혈구세포 등과 결합하여 지혈 플러그(primary hemostatic plug)를 형성[26]하므로, 혈소판 응집저해제는 항혈전제로 사용되고 있다. 복분자주 주박의 혈소판 응집저해를 평가하기 위해, 먼저 용매 대조구인 DMSO첨가시의 area under 값을 100%로 정한 경우, 상업적 혈소판 응집저해제인 aspirin (0.25 mg/ml)은 58.4%의 혈소판 응집을 나타내었으며, 농도의 존적인 저해를 나타내었다(Table 5). 한편 복분자주 주박의 ethanol 추출물(0.25 mg/ml)은 오히려 202%의 응집을 나타내어 혈소판 응집촉진능을 나타내었으며, 열수 추출물은 93.1%의 응집을 나타내어 응집저해능은 미미하였다. 그러나 분획물

의 경우, ethanol 추출물의 butanol 분획 및 물 잔류물과 열수 추출물의 butanol 분획에서 39.3~54.6%의 혈소판 응집을 나타내어 aspirin에 필적하는 저해능을 나타내었다. 주박 추출물 및 분획물이 정제되지 않은 상태를 감안하면, 상기의 결과는 복분자주 주박 추출물의 butanol 분획 및 물 잔류물을 이용한 혈소판 응집저해제 개발이 가능함을 제시하고 있다. 한편 인간 적혈구를 이용한 주박 추출물 및 분획물의 용혈활성을 평가한 결과, 0.5 mg/ml 농도까지 6.7% 이하의 용혈활성을 나타내어 실제적인 적용시 급성독성은 나타나지 않으리라 판단되었다(결과 미제시). 이상의 연구결과는 현재 폐기되고 있는 복분자주 주박 추출물의 활성 분획물을 이용하여 항균, 항산화, 항혈전 소재 개발이 가능함을 제시하고 있다.

#### 감사의 글

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

#### References

1. Cha, W. S., Park, M, S. and Park, K. M. 2001. Physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 409-415.
2. 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.

3. Choi, H. S., Kim, M. K., Park, H. S., Kim, Y. S. and Shin, D. H. 2006. Alcoholic fermentation of bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wine. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 543-547.
4. Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J. and Park, H. J. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1436-1441.
5. Chung, T. H., Kim, J. C., Lee, C. Y., Moon, M. K., Chae, S. C., Lee, I. S., Kim, S. H., Hahn, K. S. and Lee, I. P. 1997. Potential antiviral effects of *Terminalis chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* against duck hepatitis B virus (DHBV). *Phytother. Res.* **11**, 179-182.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Kim, M. S., Lee, Y. S., Kim, J. S., Shin, W. C. and Sohn, H. Y. 2015. Evaluation of *in-vitro* antithrombosis and anti-oxidation activity of lees of takju (Wookukseng). *J. Life Sci.* **25**, 425-432.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Lee, J. H., Choi, H. R., Lee, S. J., Lee, M. J., Ko, Y. J., Kwon, J. W. and Lee T. B. 2014. Blood pressure modulating effects of black raspberry extracts *in vitro* and *in vivo*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **46**, 375-383.
16. Lee, M. K., Lee, H. S., Choi, G. P., Oh, D. H., Kim, J. D., Yu, C. Y. and Lee, H. Y. 2003. Screening of biological activities of the extracts from *Rubus coreanus* Miq. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **11**, 5-12.
17. Lee, M. W. 1995. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanus*. *Yakhuk Hoeji* **39**, 200-204.
18. Lee, S. J. 2013. Physico-chemical characteristics of black raspberry fruits (Bokbunja) and wines in Korea. *Kor. J. Food Sci. Technol* **45**, 451-459.
19. Lee, S. J. and Ahn, B. M. 2009. Changes in physicochemical characteristics of black raspberry wines from different regions during fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **41**, 662-667.
20. Lee, S. J., Choi, H. R., Lee, J. H., Kwon, J. W., Lee, H. K., Jeong, J. T. and Lee, T. B. 2014. Effects of unripe black raspberry extracts on prostate cancer cell line and rat model of benign prostatic hyperplasia. *J. Kor. Soc Food Sci. Nutr.* **43**, 507-515.
21. 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.
22. Lee, Y., Kim, J. C., Hwang, K. T., Kim, D. H. and Jung, C. M. 2013. Quality characteristics of black raspberry wine fermented with different yeasts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 784-791.
23. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
24. 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.
25. 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.
26. Son, W. R. and Choi, S. W. 2013. Biological activity and analysis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from mulberry (*Morus alba* L.) wine. *Kor. J. Food Preserv.* **20**, 877-885.
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 glucosylceramides contained in sake lees. *J. Oleo. Sci.* **63**, 15-23.
29. Valentina, U., Fabrice, 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. Yang, H. J., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Heo, J. H. and Jeong, D. Y. 2015. Screening of biogenic amine non-producing yeast and optimization of culture conditions using statistical method for manufacturing black raspberry wine. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 592-601.
31. Yang, H. M., Lim, S. S., Lee, Y. S., Shin, H. K., Oh, Y. S. and Kim, J. K. 2007. Comparison of the anti-inflammatory effects of the extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus*

occidentalis. Kor. J. Food Sci. Technol. 39, 342-347.  
32. Yoon, H. J., Park, S. Y., Oh, S. T., Lee, K. Y. and Yang, S. Y. 2011. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression

and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. J. Life Sci. 21, 44-55.

**초록 : 복분자주 주박의 항균, 항산화 및 항혈전 활성**

김미선<sup>1</sup> · 강동균<sup>2</sup> · 신우창<sup>3</sup> · 손호웅<sup>1\*</sup>  
(<sup>1</sup>안동대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>경상북도 농업기술원, <sup>3</sup>(주)국순당)

복분자는 당도가 낮고 신맛이 강해 과실주로 주로 제조되고 있으며, 복분자주 제조 후 부생되는 주박은 대부분 폐기되고 있다. 본 연구에서는 현재까지 생리활성이 보고된 바 없는 복분자주 주박을 대상으로 열수 추출물, ethanol 추출물 및 이들의 다양한 분획물을 조제하여 항균, 항산화 및 항혈전 활성을 평가하였다. 그 결과, 복분자주 주박의 ethylacetate (EA) 분획은 413~459 mg/g의 높은 polyphenol을 함유하고 있으며, 그람양성세균에 대한 강력한 성장억제 활성과, DPPH 음이온, ABTS 양이온에 대한 우수한 radical 소거능, nitrite 소거능 및 환원력을 나타내었다. 또한 혈액내의 thrombin, prothrombin, coagulation factor 에 대한 저해를 통한 혈액응고저해 활성이 우수하였다. 복분자주 주박의 butanol 분획은 우수한 항산화력과 함께 내인성 혈전 생성에 관련된 aPTT 연장활성을 나타내었으며, aspirin에 필적하는 강력한 혈소판 응집저해 활성을 나타내었다. 한편 복분자주 주박의 열수 추출물의 순차적 유기용매 분획 후의 물 잔류물은 aspirin보다 강력한 혈소판 응집저해를 나타내어 새로운 항혈소판제 개발 소재로 이용 가능성을 확인하였다. 본 연구결과는 폐기되고 있는 복분자주 주박을 이용한 고부가가치 식품 및 항장소재 개발이 가능함을 제시하고 있다.