

밤나무 잎차의 항알레르기 효과

최옥범 · 김경만* · 류경수* · 박근형
전남대학교 식품공학과, *전남대학교 약학대학

Anti-allergic Effects of *Castanea crenata* Leaf Tea

Ok-Beom Choi, Kyung-Man Kim*, Gyurmg-Soo Yoo* and Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University

*College of Pharmacy, Chonnam National University

Abstract

Regarding the characteristics of allergic diseases, preventive and continuous treatment is desirable, and tea would be the one of the best functional food formula for it. Here we report the development of tea processing method for the leaves of *Castanea crenata*. Two forms of *Castanea crenata* leaf tea were prepared, non-fermented steaming tea and semi-fermented rolling tea. Anti-allergic actions of *Castanea crenata* leaf tea were assessed by testing their effects on the degranulation of mast cells. For this, hexosaminidase release (degranulation marker) from RBL-2H3 cells (mast cell line) was used. At the concentration of 300 µg/mL of the water extract, the degranulation of RBL-2H3 cells were inhibited 50.4% and 35.4% by non-fermented steaming tea and semi-fermented rolling tea, respectively. These results suggest that the tea processing method we developed could provide a valuable resource for the treatment of allergic diseases.

Key words: *Castanea crenata* leaf tea, hexosaminidase assay, anti-allergic effects

서 론

대부분의 알레르기 반응은 시간적 경과와 초기의 주요한 양상에 따라서 크게 즉시형, 면역 복합체형 및 지연형 반응 등 몇가지로 분류될 수 있다.

보통 알레르기라고 불리는 제I형 anaphylaxis는 일정한 항원에 대하여 이미 감작(sensitization)된 개체에 부착되어있는 항체에 항원이 결합한 후 수분내에 일어나는 즉시형 반응이며 3단계로 구분하여 설명할 수 있다^(1,2). 1 단계는 IgE 항체의 생성과 감작의 단계이며 인체에 들어온 외인성 항원이나 생체에서 유래한 외인성 항원은 macrophage에 의해 처리되어 T세포와 B세포를 자극한다. 이때 B세포는 helper T세포의 보조를 받아 형질세포로 분화되어 IgE 항체를 생성·분비하며, 생성된 IgE 항체는 비만세포나 호염기구의 세포막 표면에 있는 Fcε 수용체에 결합하여 감작이 성립된다^(3,4). 2 단계는 탈 과립 단계이다. 즉, 다시 침입한 동일한 항원이 비만세포나 호염기구에 결합되어

있는 IgE 항체사이에 cross linking을 형성하면 세포막이 활성화 되고 일련의 효소반응을 거친다음 짧은 시간내에 탈 과립되어 화학적 전달물의 유리가 일어난다^(5,6). 3단계는 화학적 전달물질들에 의한 모세혈관 투과성 항진, 평활근 수축 및 분비항진 등으로 인한 조직장해가 일어난다.

이러한 알레르기성 질환으로는 기관지 천식, 고초염, 담마진, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염 및 알레르기성 위장염 등이 있는데, 현대 사회의 산업화에 따른 환경오염 등으로 인해 알레르기성 질환은 해마다 증가하고 있으며, 국내외에서 심각한 문제로 대두되고 있고 우리나라에서도 인구의 약 12~20% 정도가 알레르기성 질환에 반응을 보이고 있는 실정이다. 이러한 알레르기성 질환의 치료약으로 종래에는 bronchodilator, antihistamines, antispasmodic drugs, steroids 등의 allopathic drugs가 사용되어 왔고, 근래에는 화학적 전달물질의 유리억제 및 길항작용이 있는 disodium cromoglycate (DSGC), tranilast, ketotifen, azelastine 등이 사용되고 있으며^(7,9), 여러 가지 새로운 약제의 개발이 시도되고 있다. 특히 식물유래의 민간약 및 천연물을 이용한 항알레르기 물질의 탐색과 개

Corresponding author: Keun-Hyung Park, Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, 300 Yongbong-Dong, Kwangju 500-757, Korea

발에 많은 연구가 진행되고 있으며, 일부 생약과 한방제를 이용하여 알레르기 반응에 미치는 영향을 실험한 결과 지실, 시호, 오미자, 황금 및 대추 등에서 유의성있는 억제효과를 보고 한 바 있다⁽¹⁰⁾.

한편, 밤나무는 참나무과에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있으며⁽¹¹⁾, 과실을 주로 식용, 약용, 가공식품 등으로 이용하고 있다. 그러나 잎은 우리나라와 유럽등지에서 옷나무에 의한 알레르기 질환(lacquer poisoning)이나 천식성 기침(whooping cough) 등에 민간약⁽¹²⁾으로 이용하고 있는 정도 외는 별로 활용되지 못하고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 밤나무 잎의 유용성분을 식품으로 활용할 수 있는 방안으로 잎을 이용해 차로 제조한 다음, 제조된 밤나무 잎차의 항알레르기 효과를 검증하여 보고 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 밤나무(*Castanea crenata* S. et Z) 잎은 전라남도 보성군에서 잎이 여리지않고 또한 경화되지 않아 제차용으로 적당한 시기인 5월 하순에엽장 14 cm×엽폭 5 cm정도의 밤나무 잎을 채취하여 잎자루를 제거하고 정선한 다음 차의 제조에 이용하였다.

밤나무 잎차의 제조

밤나무 잎차는 대표적인 차의 형태인 불발효차와 반발효차의 제조방법^(13,14)을 응용하여 Fig. 1에 제시한 바와 같이, 잎을 증제한 후 효소활성을 억제시켜 건조하여 만든 불발효차인 증제차와, 잎을 유념한 뒤 위조시켜 효소작용을 이용하여 만든 반발효차의 형태인 유념차로 제조하였다. 증제차는 정선한 밤나무 잎을 연속형 송대식 증열기를 이용하여 0.2 kg/cm²의 수증기압으로 99°C에서 30초 동안 잎을 증열시켰다. 증열공정을 거친 잎은 배출구의 끝에서 연속적으로 송풍기를 통해 급냉시킨 다음 격자형의 열풍건조기 선반위에 고르게 펴서 선반식 순환 열풍건조기에서 50~60°C에서 10시간 동안 건조시킨 후 차 제조용 분쇄기로 2 mm이하의 크기로 분쇄하여 황차로 만들어 티백 또는 알루미늄 포장하였다.

유념차는 정선한 밤나무 잎을 18~20°C의 실내에서 약간 두텁게 펴서 8시간 동안 음건 위조시킨 후 가압식 유념기를 이용하여 투입된 원료 밤나무 잎의 1~1.2 배의 중량을 하방으로 가하면서 1분당 45~50회 정도를 회전시키면서 20분간 유념 하였다. 유념 공정을 마

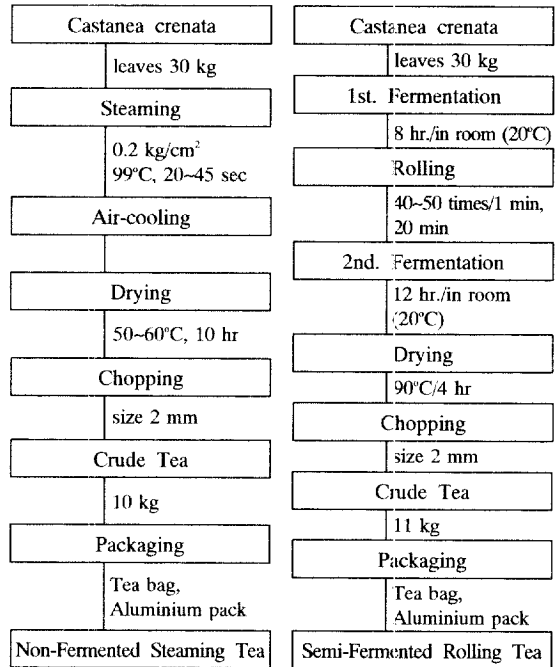


Fig. 1. Flow diagram of non-fermented steaming tea and semi-fermented rolling tea processing with *Castanea crenata* leaves.

친 밤나무 잎은 비닐로 가볍게 덮은 다음 20°C의 실내에서 12시간 동안 2차 발효시켰다. 2차 발효가 끝난 밤나무 잎은 선반위에 고르게 편 다음 증제차와 같이 선반식 열풍건조기를 이용하여 90°C에서 4시간 동안 건조시킨 후 분쇄하여 황차로 만들어 티백 또는 알루미늄 포장하였다.

항알레르기 시료의 추출 및 실험

항알레르기 효과를 실험하기위한 밤나무 잎차의 추출물은 증제차와 유념차를 각각 40~50 mesh로 분쇄하여 2 g을 100 mL의 증류수로 30분 열수추출한 후 냉각하였다. 추출물을 다시 1,400×g에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 동결건조하여 실험재료로 사용하였다.

항알레르기 효과의 검증은 Choi 등⁽⁹⁾의 enzyme assay방법을 이용하여 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 효과를 측정하였다. 즉, Fig. 2에 제시한 바와 같이 미국 국립보건원에서 분양받은 RBL-2H3 세포를 3% fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)에 현탁시킨 후 24-well plate에 각 well당 2×10⁵개의 세포가 들어가도록 처리한 다음 각 well당 50 µg /EMEM 1 mL

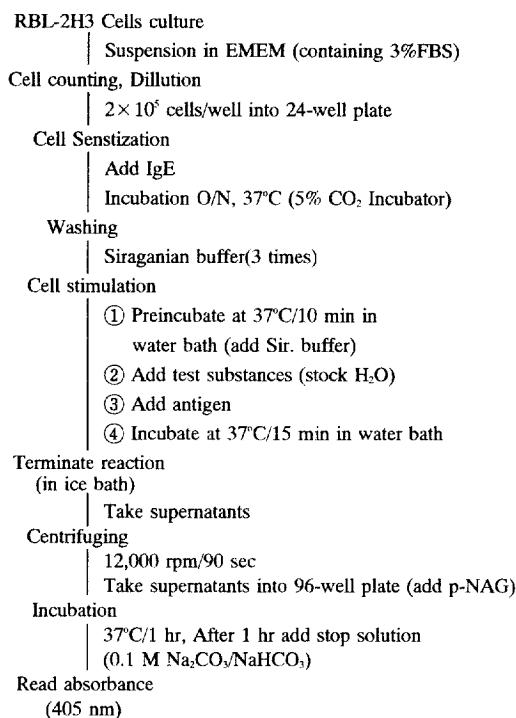


Fig. 2. Flow diagram of hexosaminidase assay for anti-allergic action.

의 IgE로 감작시킨 후 5%의 CO₂ incubator에서 하룻밤 배양하였다. 8시간 후 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 세척한 다음 37°C에서 10분간 각 well당 Siraganian buffer 160 µL로 전반응 시키고, 시험물질을 첨가후 10분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 37°C에서 30분간 antigen (chicken egg albumin, 20 µL, 10 µg/mL)을 처리하여 탈 과립상태로 만든 후 반응을 ice bath에서 종결시키고 상정액 100 µL를 취해 12,000 rpm에서 90초 동안 원심분리한 뒤 다시 상정액 20 µL를 96-well plate에 옮긴 후 기질(20 µL, 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide)을 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 다음 각 well당 stop solution (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃) 200 µL를 넣은 후 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

밤나무 잎차의 특성

대표적인 녹차의 제조방법인 불발효차와 반발효차

의 제조법을 응용하여 증제차와 유념차로 밤나무 잎차를 제조하였다. 제조된 증제차는 잎을 채취 후 곧바로 증열시켜 효소활성을 억제하여 고유의 선명한 색을 유지하였고, 밤나무 잎 특유의 상쾌한 풋내를 가지고 있으며, 생엽 30 kg에서 제조된 차는 10 kg이었고, 수분함량은 5.2%였다. 유념차는 반발효차 특유의 제조공정인 위조공정을 실시하여 1차 발효시킨 후 유념하여 잎의 미묘한 화학변화를 일으키고 성분의 용출을 용이하게 한 다음 2차 발효 공정을 거쳐 반발효차의 특징적인 방향성과 독특한 맛을 가지고 있으며, 효소반응이 진행되어 우롱차와 같은 적갈색을 나타내었고 생엽 30 kg에서 제조된 차는 11 kg이었으며, 수분함량은 6.4%였다.

밤나무 잎차의 항알레르기 효과

시험물질의 항알레르기 효과를 측정하기 위한 방법으로 한때는 IgE로부터 감작된 비만세포에서 유리된 히스타민의 양을 측정하였다. 그러나 이 방법은 비만세포에서 히스타민 농도가 매우 낮고 또한 복잡한 여러단계를 거쳐야 하기때문에 큰 편차를 나타내기 쉽다. 따라서 새로운 측정방법이 요구되어 현재는 hexosaminidase assay가 널리 이용되고 있다. Hexosaminidase는 높은 농도로 cell내에 존재할 뿐아니라 다른 화학적 매개체들이 탈 과립되어 방출될 때 함께 배출되므로 hexosaminidase활성 측정은 탈 과립의 지표로 이용될 수 있으며, 또한 이 효소의 반응으로 생성된 생성물은 자외선 영역에서 용이하게 측정될 수 있기 때문에 유리된 히스타민의 양을 측정하는 방법을 대

Table 1. Inhibition effects of water extracts from *Castanea crenata* leaf tea on hexosaminidase release from RBL-2H3

Sample	Dose (µg/ml)	Absorbance (405 nm)	Inhibition (%) ¹⁾
Total ²⁾		0.949±0.045 ³⁾	
Control		0.356±0.010	
Non-fermented Steaming tea	300	0.180±0.020	50.42±5.20
Semi-fermented Rolling tea	300	0.230±0.020	35.39±5.34
Quercetin	300	0.060±0.005	83.15±3.08

¹⁾Inhibition (%)=(Control absorbance-Sample absorbance)/Control absorbance×100. Spontaneously released hexosaminidase (not challenged with antigen) was subtracted from the control and *Castanea crenata* leaf tea treated group.

²⁾Total represents the whole amount of hexosaminidase in the cell.

³⁾Each of absorbance represents the mean±S.E of 4 experiments.

제할 수 있는 assay법으로 이용될 수 있다. 이에 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 활성을 측정할 수 있는 enzyme assay방법으로 밤나무 잎차 추출물의 항알레르기 효과를 검정한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 추출물 300 µg/mL의 수준에서 증제차는 50.4%, 유념차는 35.4%의 저해 효과를 나타냈다. 한편, 대조구로 사용한 quercetin은 같은 농도에서 83.15%의 저해 효과를 나타냈다. 밤나무 잎차 추출물이 조추출물(crude extracts) 상태인 점을 고려해 보면 밤나무 잎차는 상당한 항알레르기 효과가 있음이 확인되었다.

요 약

밤나무 잎을 이용하여 차로 제조한 다음, 제조된 차에서 항알레르기 효과를 실험하였다. 밤나무 잎 차는 대표적인 차의 형태인 불발효차와 반발효차의 제조공정을 이용하여 증제차와 유념차로 제조하였으며, 항알레르기 효과는 제조된 증제차와 유념차의 각각의 물추출물을 RBL-2H3 세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 정도를 측정하는 enzyme assay를 이용하여 실시한 결과, 물추출물의 300 µg/mL의 수준에서 증제차는 50.4%의 저해효과를 나타냈으며, 유념차는 35.4%의 저해효과를 나타내어 항알레르기 효과가 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산부 첨단농업기술개발 사업비의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Coombs, R.R. A and Gell, P.G. H: Classification of al-

lergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunology.*, 3rd ed., Blackwell Sci. Pub., Oxford, 761-779 (1975)

2. Siraganian, R.P., Hook, W.A. and Levine, B.b.: Specific *in vitro* histamine release from basophils by bivalent haprens: the evidence for activation by simple bridging of membrane bound antibody. *Immunochemistry.* **12**, 149-157 (1975)

3. Kinet, J.P., Metzger, H., Hakimi, J. and Kochan, J.: A cDNA presumptively coding for the alpha subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Biochemistry.* **26**, 4605-4610 (1987)

4. Conard, D.H., Bazin, H., Schon, A.H., and Foese, A.: Binding parameters of the interaction between rat IgE and rat mast cell receptors. *J. Immunol.* **114**, 1688-1691 (1975)

5. Samuelsson, B.: Leukotrienes, mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* **228**, 568-575 (1983)

6. Ishizaka, T., Ishizaka, K., Conard, D. H and Foese, A.: A new concept of triggering mechanisms of IgE-mediated histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* **61**, 320-330 (1978)

7. Tasaka, K.: Antiallergic drugs. *Drugs of Today*, **22**, 101-133 (1986)

8. Sakamoto, K., Nagai., and Koda, A.: Role of hyaluronidase in immediate hypersensitivity reaction. *Immunopharmacology*, **2**, 139-146 (1980)

9. Kakegawa, H., Matsumoto, H., and Satoh, H.: Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642-646 (1985)

10. Kim, Y.R.: Anti-allergic action of some crude drugs. *Ph. D. Thesis*, Chonnam National Univ., Seoul, Korea (1992)

11. Lee, T.-B.: Illustrated flora of Korea. *Hyangmoon Press*, Seoul p.273 (1994)

12. Roberto Chiej : The Macdonald encyclopedia of medical plants. *Macdonald Press*, Britain, No. 72 (1984)

13. 中林敏郎 : 綠茶, 紅茶, 烏龍茶의化學と機能, 弘學出版, 川崎, p.10 (1991)

14. 日本 静岡縣 茶業會議所, 新茶業全書, p.327 (1988)

15. Choi, O.H., Kim, J.H. and Kinet, J.H.: Calcium mobilization via sphingosine kinase in signaling by the FcεRI antigen receptor. *Nature*, **380**(6575), 634-656 (1996)

(1997년 12월 26일 접수)