

## 상황버섯균사체배양액에 침지한 발아현미의 항산화 및 nitric oxide 합성저해에 관한 연구

정일선 · 김유정 · 최인순<sup>1</sup> · 최은영<sup>1</sup> · 신수화<sup>1</sup> · 갈상원<sup>2</sup> · 최영주\*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, <sup>1</sup>생명과학과, <sup>2</sup>진주산업대학교 미생물공학과

Received June 12, 2007 / Accepted July 24, 2007

**Studies on Antioxidant Activity and Inhibition of Nitric Oxide Synthesis of Germinated Brown Rice Soaked in Mycelial Culture Broth of *Phellinus linteus*.** Il Sun Jung, Yu Jung Kim, In Soon Choi<sup>1</sup>, Eun Young Choi<sup>1</sup>, Su Hwa Shin<sup>1</sup>, Sang Wan Gal<sup>2</sup> and Young Ju Choi\*. Department of Food and Nutrition, <sup>1</sup>Department of Life Science, Silla University, Busan 617-736, <sup>2</sup>Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea – This study investigated the effects on the biological activities of germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. The level of free amino acid was higher in the GBRP extract than those of BR and GBR. The major free amino acids were alanine, valine, isoleucine and methionine in both extracts. The level of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) was also increased significantly in the GBR and GBRP. Antioxidant activities of methanol extract of BR, GBR and GBRP were measured by using DPPH radical scavenging and SOD-like activity. Antioxidant activities showed the highest level of 83% and 76% when 100 mg/ml GBR and GBRP, respectively. Stimulation of the macrophages RAW264.7 cells with lipopolysaccharide (LPS) resulted in increased production of nitric oxide (NO) in the medium. However, the methanol extract of GBR and GBRP showed marked inhibition of NO synthesis in a dose-dependent manner. These results showed that GBR and GBRP were significant role for activation of immune system in the pathogenesis of inflammatory diseases.

**Key words** – *Phellinus linteus*, GABA, nitric oxide, germinated brown rice

### 서 론

최근 건강에 대한 관심이 급증하면서 각종 건강식품에 대한 수요가 증가하고 특히 주식으로 하는 쌀과 발아생식을 대체 건강식품으로 변환시키는 연구도 활발히 진행되고 있다. 발아현미란 왕겨를 벗겨낸 현미를 적절한 수분, 온도, 산소를 공급해 1-5 mm정도 싹을 틔운 것을 말한다. 현미가 발아하게 되면 씨앗 상태와는 다른 영양소들을 포함하게 된다. 싹이 난 현미는 소화흡수가 좋을 뿐만 아니라 혈압강화, 뇌기능개선, 면역력증가 등 여러 가지 효능이 입증된  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), arabinoxylane, inositol, ferulic acid 등의 기능성 성분이 증가되거나 새로이 생성되는 것으로 알려지면서 발아현미는 새로운 건강기능성식품의 하나로 주목받고 있다[1,21]. 특히 GABA는 비단백 구성아미노산으로 자연계에 널리 분포하며 포유동물의 뇌나 척수에서 억제성 신경전달물질로 잘 알려져 있다[25]. GABA는 뇌의 혈류를 활발하게 하여 뇌세포의 대사기능을 향상시키고, 성장호르몬의 분비조절에도 관여하며, 혈압강화 및 통증완화 등 생리적 메카니즘 조절에 관여한다[3,20]

발아현미는 아미노산, 단백질, 식이섬유, 칼슘, 인, 철 등의 영양분이 현미나 백미보다 많으며 현미의 소화를 방해하는

피틴산이 인과 이노시톨로 바뀌어 소화가 잘되는 장점이 있다[11,14]. 발아현미에 대한 연구는 발아현미를 식품소재로 개발하기 위한 연구[5,15], 발아현미의 GABA 성분을 증진시키기 위한 연구[6,24] 및 생리활성연구[12,26] 등과 같이 여러 분야에서 진행되고 있으나 발아 현미의 품질 향상을 위한 기능성 발아현미를 개발하기 위하여 상황버섯 균사체 배양액의 활용에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

상황버섯은 소나무 비늘버섯과의 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하며 주로 뽕나무와 활엽수의 줄기에 자생하는 것으로 일 반명칭은 목질 진흙버섯(*Phellinus linteus*)이라고 하는데 초기에는 노란 진흙덩이가 뭉친 것 같은 형태로 유지된다[4]. 상황버섯은 생리활성 및 항암력이 뛰어난 버섯으로 소비자의 관심이 증대되면서 기능성 식품 및 식품·의약소재로 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[13,16].

Nitric oxide (NO)는 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 다양한 생리 및 병리적 과정에 관여하는 다기능성 생체분자이다. NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 최근 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[9,18].

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

본 연구에서는 발아현미를 상황버섯 균사체배양액에 침지시켜 기능성 발아현미 싹을 개발하여 현미, 발아현미, 상황버섯 발아현미의 유리아미노산, 식미 및 항산화 활성을 조사하였으며, 또한 macrophage RAW264.7 세포를 이용하여 nitric oxide scavenging 활성도 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시료 추출

실험에 사용한 현미, 발아현미 및 상황버섯 발아현미는 폴엔필바이오사로부터 구입하여 사용하였다. 분쇄한 시료분말에 80% 메탄올을 넣고 실온에서 추출·여과하는 과정을 3회 반복하였다. 현미, 발아현미, 상황버섯 발아현미의 총 메탄추출물은 rotary evaporator로 감압농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

### 유리 아미노산 함량 측정

현미, 발아현미 및 상황버섯발아현미를 믹서기(Waring blender)로 grinding한 후 100 mesh로 거른 시료 5 g 을 70% EtOH 25 ml을 혼합하여 shaking 한 다음 시료용액을 3000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액 1 ml를 취하여 감압 상태에서 완전히 건조한 후 0.5 ml lithium citrate buffer에 녹여 PDVF filter로 거른 다음 아미노산 자동분석기(Biochrom, England)로 분석하였다.

### 전자공여능(Electron donation ability : EDA) 측정

전자공여능 측정은 Blois의 방법[2]에 따라서 각 추출물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정 하였다. 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여 시료 40  $\mu$ l와  $1.5 \times 10^{-4}$ M DPPH용액 160  $\mu$ l를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은  $EDA(\%) = (\text{대조구흡광도} - \text{시료첨가구흡광도}) / \text{대조구흡광도} \times 100$ 으로 계산하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조그룹과 흡광도차를 비교하여 프리라디칼의 제거활성을 백분율로 나타내었다.

### Superoxide dismutase -like activity (SODA) 측정

추출물의 SOD 유사활성은 Marklund 와 Marklund의 방법[18]에 따라 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 추출시료를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 시료 10  $\mu$ l에 pH 8.5로 보정된 Tris-HCl buffer (50 mM tris [hydroxymethyl] aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.5) 150  $\mu$ l와 7.2 mM pyrogallol 10  $\mu$ l를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50  $\mu$ l를 가하여 반응을 정지시켰

다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA reader를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$SODA(\%) = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도, B : 추출물 무첨가구의 흡광도

### Nitric oxide assay 및 cell viability 측정

NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite 양을 측정하였다. 대식세포를 세포 96-well microtiter plate에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 세포가 되도록 재부유하여 LPS의 자극하에 24시간 배양하고 그 배양 상층액 내의 NO를 Griess 시약과 반응시켜 측정하였다[9]. 100  $\mu$ l의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약 [1% sulfanilamide (30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (60% acetic acid) 혼합액] 을 가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기를 사용하여 800  $\mu$ g/ml 농도 범위에서 540 nm 흡광도를 측정하였다.

세포활성은 MTT assay에 의하여 측정하였다[17]. 96-well microtiter plate (Falcon, USA)에 RAW 264.7 macrophage를  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 추출물이 함유되어 있는 배지를 100  $\mu$ l씩 넣어 48시간 동안 배양하였다. Plate에 MTT 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 20  $\mu$ l 씩 첨가하여 4시간 동안 배양시키고 formazan을 형성시키 후 조심스럽게 상등액을 제거하였다. DMSO 150  $\mu$ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 유리 아미노산 함량 측정

현미, 발아현미와 상황버섯균사체 배양액에 침지된 발아현미의 유리아미노산 함량변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 표에 나타난바와 같이 상황버섯균사체배양액에 침지된 발아현미의 유리아미노산 함량은 현미 및 발아현미에 높은 함량을 나타내었다. 주요 유리아미노산은 Pro, Ile, Leu, aromatic amino acid, GABA 및 Lysine 등으로 분석되었다.

발아현미에 대한 연구는 발아조건에 다른 GABA 함량변화에 대한 연구로 키토산 처리가 발아현미 중의 GABA 함량을 현저히 증가하는 것으로 보고하고 있으며, 또한 GABA 생성 증진이 GAD의 활성증진에 기인하는 것으로 알려져 있다 [10,21]. 식물에서 GABA 함성은 여러 외부 환경적 스트레스에 의해서 유도되는 것으로 보고되고 있으며[3,7], 식물에서 GABA 합성체계는 glutamic acid, GAD, 칼슘, calmodulin

Table 1. The comparison of free amino acid of brown rice(BR), germinated brown rice(GBR), and germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus lintus*(GBRP)

Amino acids compositions	Content %(w/w)		
	BR	GBR	GBRP
Glutamic acid	3.3000	5.6000	2.8000
Ethanolamine	0.6000	0.9000	0.6000
Histidine	0.4000	1.6000	1.2000
Gamma-aminobutyric acid	2.4000	12.2000	12.2000
Serine	1.0000	4.5000	5.0000
3-Methylhistidine	0.0000	1.0000	1.6000
Asparagine	4.0000	1.2000	2.3000
Arginine	1.6000	2.4000	5.4000
Isoleucine	0.2000	2.1000	5.3000
Proline	1.1000	2.1000	5.7000
threonine	0.4000	1.6000	4.5000
Lysine	0.3000	0.7000	2.0000
Tyrosine	0.4000	2.2000	7.0000
Aspartic acid	1.2000	1.5000	4.8000
Leucine	0.5000	3.2000	10.4000
Phenylalanine	0.2000	1.9000	6.8000
Alanine	3.0000	2.8000	11.2000
Valine	0.7000	4.1000	17.5000
Methionine	0.0000	0.4000	2.5000
Ammonium chloride	0.9000	0.7000	4.6000
Glycine	0.7000	0.4000	2.9000
Citrulline	0.0000	0.0000	1.3000
Cystine	0.0000	0.1000	1.8000
Hydroxyproline	0.0000	0.0000	1.4000
Homocystine	0.0000	0.0000	1.7000
beta-Alanine	0.0000	0.3000	6.9000

등의 여러 인자가 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다[31]. GABA가 고혈압의 예방, 통증의 완화 등의 중요한 역할을 하는 것으로 알려지면서 기능성 식품 소재로서의 GABA에 대한 관심이 집중되고 있다. 이 밖에도 상황버섯 발아현미에는 collagen의 구성아미노산인 proline 함량이 현저히 증가되었으며 방향족아미노산의 함량도 높게 나타났다. 특히 백미에 부족한 lysine 함량도 높게 나타나 상황버섯발아현미의 제품의 개발가능성을 높여주고 있다.

**DPPH법에 의한 항산화활성측정**

발아현미를 침지하기 위하여 사용된 상황버섯균사체 배양액의 DPPH free radical scavenging 활성은 균사체 배양액에서 약 60% 이상의 소거능을 나타내었다(Fig. 1). 현미, 발아현미 및 상황버섯발아현미의 메탄올 추출물의 항산화력은 Fig. 2에 나타난바와 같이 5 mg/ml 에서 65% 이상의 소거능을 나타내었으며, 농도가 증가할수록 자유기 소거능이 증가하였다. 발아현미 추출물이 상황버섯균사체 배양액에 침지된 발아현미 추출물보다 자유기 소거능이 다소 높게 나타났다.

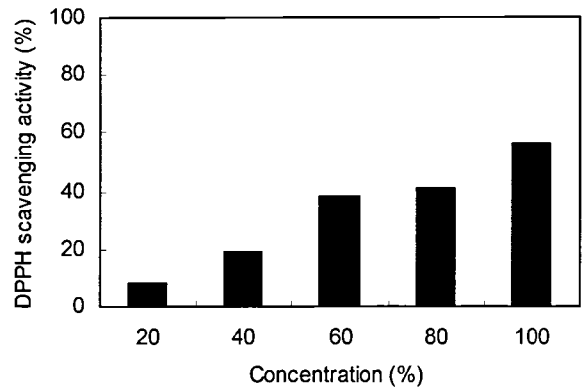


Fig. 1. Antioxidant activity of the mycelial culture broth of *Phellinus lintus*.

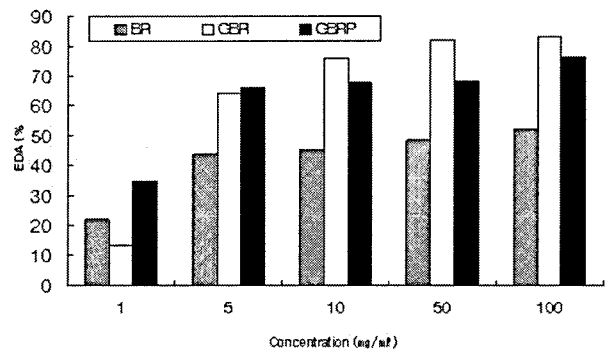


Fig. 2. DPPH radical scavenging effect of methanol extracts from the brown rice BR), germinated brown rice GBR), and germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinus lintus* (GBRP) at the concentration in the range of 1-100 µg/ml.

발아현미의 항산화력은 발아조건에 따라서 많은 차이가 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 현미의 발아정도에 따른 항산화활성이 크게 증가하는 것으로 밝혀져 있다[28]. 상황버섯 발아현미의 항산화 활성에 대한 연구는 주로 상황버섯 균사체를 발아현미에 배양한 균사체의 항산화 및 면역기능 등을 연구한 보고는 있으나, 발아현미를 상황버섯 균사체 배양에 침지한 상황버섯 발아현미의 생리활성에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

최근 항산화에 대한 관심이 증대 되면서 인공합성 항산화제를 대체할 천연항산화제의 개발에 많은 연구가 집중되고 있다. 대부분의 항산화연구가 약초를 중심으로 수행되었으며 새로운 항산화제의 개발에도 많은 연구를 집중하고 있다. 또한 해양생물에 대한 관심이 고조되면서 주로 주석으로 이용되고 있는 해조류 즉 김, 미역, 다시마, 툇 및 파래 등에 대한 항산화 및 면역기능에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.

전자 공여능은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질의 산화억제 및 활성라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 활용되고 있다. 전자공여능이 시료의 flavonoid 및 polyphenol

성 물질 등에 대한 항산화 작용의 지표로 알려져 있으며[29], 이러한 물질들이 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높다. 이러한 항산화물질은 활성 산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제 하는 척도로 이용할 수 있다[27].

**Superoxide dismutase -likeactivity (SODA) 측정**

상황버섯발아현미 추출물의 SOD 유사활성 측정 결과를 Fig. 3에 나타냈으며, SODA 측정 결과 추출물 농도가 증가할수록 항산화효과가 증가하였고, 10 mg/ml 농도에서 약 70%의 SOD 유사활성을 나타내었다. DPPH법에 의한 항산화 활성과 유사하게 SOD-like 활성도 발아현미가 상황버섯 균사체 배양액에 침지한 발아현미 추출물보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 비교적 항산화력이 높은 과일로 알려진 키위 착즙액의 SOD 유사활성(27.6%) 보다 2.5배 높은 SOD 유사활성을 나타내었다. Superoxide dismutase (SOD)는 항산화 효소로서 세포에 유해한 oxygen radical를 과산화수소 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로서 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 진행되어 있다. Nice 등[23]은 SOD 정제시 열안정성이 높고 SOD와 유사한 활성을 나타내는 물질을 함께 정제하였는데 이것은 SOD와 결합된 phenol 계 물질인 것으로 보고하였다. 따라서 항산화 및 항노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 SOD 유사활성 측정을 pyrogallol의 자동산화 반응을 이용하여 분석하였다.

**Nitric oxide assay 및 cell viability**

대장균 Bacterial lipopolysaccharise (LPS)를 대식세포에 처리하여 NO를 유도시킨 다음 상황버섯발아현미 추출물을

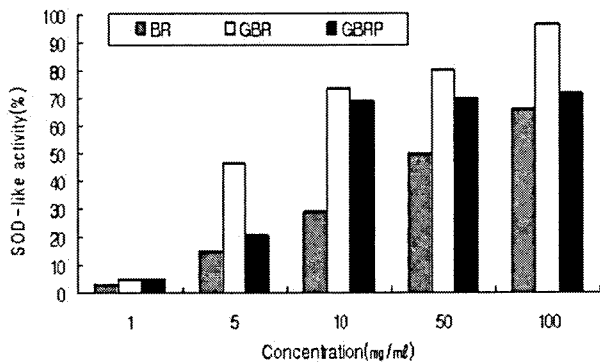


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of brown rice (BR), germinated brown rice (GBR) and germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinis lintus* (GBRP)

대식세포에 처리하여 NO 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 4에 나타난바와 같이 LPS에 의하여 유도된 NO 활성은 상황버섯발아현미 추출물을 첨가함으로써 NO 합성이 400 µg/ml 농도에서 80%까지 현저히 감소하였다. 이러한 결과는 상황버섯발아현미 추출물이 면역기능과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 것이다. 일반적으로 암에 걸린 세포는 NO 활성이 증가하는데 항암제 등을 투여하면 NO 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다.

세포활성은 Fig. 5에 나타난바와 같이 MTT 분석을 통해서 측정하였다. LPS로 처리된 대식세포와 거의 같은 수준으로 상황버섯발아현미 추출물을 500 µg/ml 까지 처리했을 때 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

NO는 면역학적 방어에서 중요한 역할을 수행하고, 분비 조직과 세포의 기능에 영향을 미치며, 세포성 면역계의 주된 역할의 하나로 NO는 세포 독성이나 성장 억제 활성을 나타낸다[8]. NO는 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 nitric

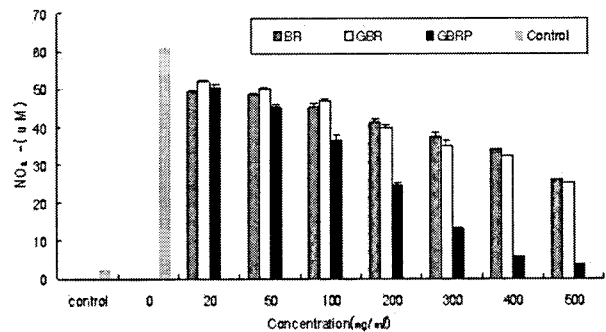


Fig. 4. Effects of the brown rice BR), germinated brown rice (BR) and germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinis lintus* (GBRP) on NO synthesis in RAW264.7 cells stimulated with LPS. RAW264.7 cells were cultured for 24 hr with various concentration in the presence of LPS. NO release was measured using the method of Griess (nitrite). Results are expressed as means±S.E. of three independent experiments.

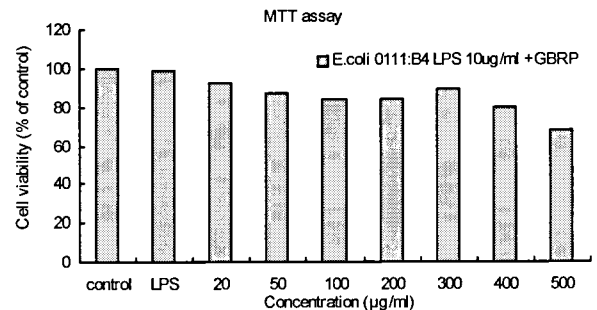


Fig. 5. Cytotoxic activity in germinated brown rice soaked in mycelial culture broth of *Phellinis lintus* (GBRP) in RAW264.7 cells. Cytotoxicity was determined by MTT assay and values are mean with standard deviation of triplicate experiment.

oxide synthase(NOS)에 의하여 생성된다[10].

NO는 대부분의 포유류 동물의 세포내에서 생성되고 신경계에서는 화학적 신호 전달 물질로서, 혈관계에서는 혈압 조절과 혈소판의 응집 및 호중성구의 집합 작용을, 골격근에서는 대사와 근 수축 조절 등 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 최근 NO가 신경계의 생리학적 전달자로서 뿐만 아니라, 염증 반응, 면역계 및 세포 독성 외에도 세포의 분화나 세포 내 신호 전달 등의 중요한 조절 물질로 알려지고 있다. 또한 면역 세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 다량으로 외부의 자극에 의해 유전자 수준에서 발현되고 주로 침입한 미생물이나 종양 세포에 대해 독성을 갖는 방어 물질로서 작용하는 것으로 보고되고 있다[19,22]. 특히 NO가 세포 활성화 물질 및 reactive oxygen intermediates(ROI)에 의해 유발된 세포 독성을 최소화시키는 역할이 밝혀짐으로 이 분야에 대해서 활발히 연구되고 있다.

NO가 발현하는 기능의 다양성은 농도 및 표적세포의 활성화여부에 따라 달라진다고 알려져 있다. 대식세포가 pathogen에 의하여 활성화되면 NO 뿐만 아니라 superoxide anion을 호흡과정에 의하여 대량생산되는데, NO 자신은 매우 약한 산화성을 가진 라디칼로서 vitamin E와 비슷하게 세포의 지질과산화물을 막는 항산화 기능도 수행한다는 보고도 있다. 최근 염증반응을 완화시키는데 있어서도 종래에 사용되어온 NO를 소거하는 방식보다는 superoxide anion의 생성을 저해하거나 NADPH oxidase의 활성을 감소시키는 방법[30]이 더욱 비중 있게 다루어지고 있다.

## 요 약

현미와 먹기에 용이하고 영양적 가치를 높인 발아현미 및 발아현미에 상황버섯 균사체를 배양액을 침지한 상황버섯 발아현미의 항산화, 면역기능과 여러 가지 생리학적 기능을 하는 유리아미노산 함량을 비교하였다.

발아현미 및 상황버섯발아현미의 주요 유리아미노산은 pro, ile, leu, aromatic amino acid, GABA 및 lysine 등으로 현미에 비하여 발아과정에서 유리아미노산함량이 크게 증가하는 것으로 나타났으며, 그 중에서도 상황버섯발아현미의 유리아미노산이 가장 높게 나타났다.

일반현미와 발아현미 및 상황버섯발아현미의 메탄올 추출물의 DPPH 소거능과 SOD 유사활성은 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 발아현미의 전자공여능 및 SOD 유사활성이 높게 나타났다.

상황버섯발아현미 추출물의 항산화력은 DPPH법에서 5 mg/ml 농도에서 65% 이상의 라디칼 소거능을 보였으며, SOD 유사활성은 10 mg/ml 농도에서 약 70%의 SOD 유사활성을 나타내었다.

일반현미와 발아현미 및 상황버섯발아현미의 면역기능은

세균의 LPS를 처리하여 유도된 RAW264.7 세포에서 조사되었는데 LPS를 처리하여 유도된 NO 활성을 400 µg/ml 농도로 상황버섯발아현미 추출물을 첨가함으로써 약 80%까지 NO합성을 현저히 감소시켰으며, 이 농도에서 세포독성이 없는 것으로 MTT assay에 의하여 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- Barnick, M. and J. Szafranska. 1987. Change in phytate content and phytase during the germination of some cereals. *J. Cereal Sci.* **5**, 23-28.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1198-1199.
- Brown, A. W. and B. J. Shelp. 1997. The mechanism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
- Choi, J. H., T. H. Ha and Y. D. Rho. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Korean J. Mycol.* **24**, 214-222.
- Choi, J. H. 2001. Quality characteristics of the bread with sprouted brown rice flour. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **17**, 323-328.
- Choi, H. D., Y. K. Park, Y. S. Kim, C. H. Chung and Y. D. Park. 2004. Effect of pretreatment condition on  $\gamma$ -aminobutyric acid content of brown rice and germinated brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 761-764.
- Crawford, L. A., A. W. Bown, K. E. Breitkreuz and F. C. Guinel. 1994. The synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol.* **104**, 865-871.
- Farias-Eisner, R., M. P. Sherman, E. Aeberhard and G. Chaudhuri. 1994. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9407-9411.
- Guzik, T. J., T. Korbout and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Ignarro, L. J., J. M. Fukutto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers and R. E. Byrns. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8103-8107.
- Juliano, B. O. 1985. Production and utilization of rice. In rice, *Chemistry and Technology*, 2nd ed. pp. 1-7. *Am. Assoc. Cereal Chem.*
- Kang, B. R., M. Park and H. S. Lee. 2006. Germination dependency of antioxidative activities in brown rice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 389-394.
- Kim, D. H., S. B. Han, G. T. Oh, Y. H. Kim, D. H. Hong, N. D. Hong and I. D. Yoo. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 295-303.
- Kim, J. S., B. K. Choi, H. Y. Lee, J. D. Park and H. J. Park. 2004. Physicochemical properties of germinated brown

- rice. *Korean J. Food Preserv.* **11**, 182-188.
15. Kim, S. S. and W. J. Lee. 1997. Characteristics of germinated rice as a potential raw material for sikhe production. *J. Korean Food Sci. Technol.* **29**, 101-106.
  16. Lee, K. H., H. J. Kwon, S. S. Chun, J. H. Kim, Y. J. Cho and W. S. Cha. 2006. Biological activities of extracts from *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 298-303.
  17. Lin, H. Y., S. H. Juan, S. C. Shen, F. L. Hsu and Y. C. Chen. 2003. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochemical Pharmacology* **66**, 1821-1832.
  18. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
  19. Marletta, M. A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.
  20. Mody, I. Y., Dekoninck, T. S. Otis and I. Soltesz. 1994. Bringing the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci.* **17**, 517-525.
  21. Nakagawa, K. and A. Onota. 1996. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ. *Food Processing* **31**, 43-46.
  22. Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
  23. Nice D. J., D. S. Robinson and M. A. Jolden. 1995. Characterization of a heat-stable antioxidant co-purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem.* **52**, 393-397.
  24. Oh, S. H. and W. G. Choi. 2000. Production of the quality germinated brown rices containing high  $\gamma$ -aminobutyric acid by chitosan application. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 615-620.
  25. Okada, T., T. Sugishita, T. Murakami, H. Murai, T. Saikusa, T. Horino, A. Onoda, O. Kajimoto, R. Takahashi and T. Takahashi. 2000. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **47**, 596-603.
  26. Park, D. K. 2005. Study on immunomodulatory activity of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice. Ph. D. thesis, Konkuk Univ.
  27. Pryor, W. A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
  28. Snedden, W. A., N. Koutsia G. Baun and H. Fromm. 1996. Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 4148-4153.
  29. Torel, J., J. Gillard and P. Gillard. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry.* **25**, 383-385.
  30. van der Veen, R. C. 2001. Nitric oxide and T cell immunity. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1491-1500.
  31. Yun, S. J. and S. H. Oh. 1998. Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/ calmodulin-dependent glutamate decarboxylase. *Mol. Cells* **8**, 125-129.