

Aspergillus Oryzae 를 이용한 밀기울蛋白質의 質的 向上에 關한 研究

桂承希・金尙淳・池奎萬*

숙명여자대학교 가정대학 식품영양학과

* 고려대학교 농과대학 축산학과

A Study on Improving Protein Quality of Wheat Bran by Fermentation with *Aspergillus Oryzae*

Seung Hee Kye, Soon Sang Kim and Kew Mahn Chee*

Department of Food & Nutrition, Sookmyung Womans University

*Department of Animal Science, Korea University

= ABSTRACT =

The purpose of this study was to investigate changes in nutritive quality of fermented wheat bran prepared by culturing with a microorganism, *Aspergillus oryzae*, in an attempt to improve the quality of protein in feedstuff. After incubation of wheat bran with *Aspergillus oryzae*, the contents of chemical composition, including amino acids, riboflavin and amino-nitrogen were increased, but the level of nitrogen free extract was reduced. The effects of supplementation of fermented wheat bran on the rat diets were evaluated by measuring growth rate, feed efficiency and biological values, such as NPU, PER and NPR. Sixty four male Sprague Dawley rats of 5-6 weeks of age were adopted for the feeding trial for 10 days period, and levels of dietary protein were set at 10%. The %contribution of protein from casein, wheat bran and fermented wheat bran for the other dietary treatments were, in the order, 50-50-0%, 50-30-20%, 50-20-30% and 50-0-50%, respectively.

In the result of this study, no significant difference were observed in the amount of feed intake, body weight gain and feed efficiency. On the whole, the values of NPU, PER and NPR of all the fermented wheat bran groups appeared to be higher than those of the group whose half of the protein was from wheat bran.

序 論

근래에 들어와서 飼料資源의 극심한 부족으로 인해 飼料 開發의 必要性이 점차 높아짐에 따라 微生物을 利用하여 飼料의 영양가치를 向上시키기 위한 연구가 여러 사람들에 의하여 시도되고 있으며 많은 성과를 거두고 있다.

Biely등¹⁾은 Merck회사의 酵素製品인 곰팡이 amylase를 大麥이 주체인 병아리 飼料에 첨가하여 成長促進効果와 飼料効率의 증진효과를 거두었다고 보고하였다. 또한 麴菌에서 riboflavin 생산능력이 우수한 변이주를 얻어 이를 접종 배양하여 탄수화물과 단백질의 균형이 이루어지고 riboflavin이 강화된 우수한 醱酵飼料가 製造되기도 하였고²⁾, 분리 정제된 酵素劑를 가축에 급여하여 좋은 효과를 보았다는 試驗結果도 있다³⁾.

Hall⁴⁾이나 Schafer등⁵⁾은 微生物을 이용한 製品이 비타민, 항생물질, 단백질, 아미노산, 酵素 및 未知成長因子 등을 공급할 수 있다고 하였으며 金 등⁶⁾도 *Aspergillus oryzae*를 이용해 methionine 合成을 증대시킨 醱酵飼料를 제조하였다.

이 밖에도 밀기울⁷⁾, 脫脂米糠⁷⁾⁸⁾ 또는 고구마와 澱粉粕⁹⁻¹⁶⁾등의 농산 폐기물에 微生物을 배양하여 amylase, protease, lipase, oxidase 등을 함유하게 하고, 각종 비타민을 생성시켜 동물성 단백질에 가까운 醱酵飼料製造에 관한 論文도 많이 보고되었다.

本 試驗에서는 飼料用 밀기울의 質的인 改善을 위해 *Aspergillus oryzae*를 배양하여 밀기울 醱酵飼料를 製造하였으며 이의 改善효과를 확인하기 위해 化學的 組成의 변화와 동시에 단백질의 生物學的 利用性을 측정하였다.

材料 및 方法

本 試驗에 사용한 飼料의 단백질 給원은 밀기울(wheat bran, WB), 醱酵밀기울(fermented wheat bran, FWB) 및 casein으로써, 단백질 10% 中 배합 비율에 따른 실험군의 분류는 Table 1 과 같다.

市中에서 구입한 밀기울 100g 당 58ml의 비율로 물을 첨가하면서 잘 混合하였다. 이를 15 psi 에서 15분간 殺菌한 후 40℃ 정도로 냉각시켜 種菌을 接種하고, 약 30℃로 조절된 incubator에서 48시간 培養하여 醱酵 밀기울을 제조하였다. 醱酵밀기울 製造에 사용한 菌株는 淑明女子大學校 生活科學研究所에서 保管하고 있는

Table 1. Classification of experimental groups

Dietary groups ¹⁾	% contribution of each ingredient to total dietary protein		
	Casein	Wheat bran	Fermented wheat bran
100% Casein	100	—	—
50% WB	50	50	—
20% FWB	50	30	20
30% FWB	50	20	30
50% FWB	50	—	50
N-free	—	—	—

1) refer to Table 2.

*Aspergillus oryzae*이었다.

供試動物은 生後 약 4~5週 齡인 Sprague-Dawley 種 male 64마리인데, 7일간 casein 15%-corn starch 72.8%를 함유한 사료로 적응시킨 후 7日째에 체중에 따라 한 군에 10마리씩 6개의 군으로 나누었다. 試驗이 실시되는 10일간 飼料과 물은 마음대로 섭취하도록 하였고 매일 오물처리를 하였으며 사육실 온도는 23 ± 1℃, 습도는 55 ± 2%로 유지하였다. 각 供試動物은 試驗飼料 給여전 12시간 정도 飢餓시켜서 試驗開始 체중을 구하였고 나머지 4마리는 희생시켜 開始時의 體組成을 조사하였다.

試驗飼料의 구성성분은 Table 2에서와 같다. 이 사료들은 전체적으로 탄수화물 74.6%, 단백질 10%, 지방 8%, 섬유소 3%의 성분을 함유한 飼料와, 단백질을 전혀 함유하지 않은 無窒素飼料의 두가지로 크게 나누어지며, 이들 각각에 vitamin mixture와 salt mixture를 일정량씩 첨가하여 요구량을 충족시켰으며 나머지는 corn-starch로 充당하여 전체가 100%가 되도록 하였다. 섬유소는 alpha-cellulose(Sigma Chemical CO.)로써 공급하였는데 無窒素飼料군(N-free diet)을 제외하고는 그 자체에 약 3%정도의 섬유소가 함유되어 있으므로 별도로 첨가하지 않았다.

試驗飼料의 一般組成成分 및 體조직 Nitrogen 함량은 A.O.A.C.法¹⁷⁾에 準하여 定量하였다. Amino-nitrogen은 formal적정법¹⁸⁾에 의하여 定量하였는데 phenolphthalein을 지시약으로 하고 0.1N NaOH로써 적정하였다.

醱酵밀기울 內의 riboflavin함량은 lumiflavin 형광法¹⁹⁾에 의하여 fluorescences spectrophotometer(Hitachi 650-40)로써 측정하였다. 한편 밀기울과 醱酵 밀기울의 총 아미노산함량을 분석비교하였는데 진공상

Table 3. Changes in chemical compositions of wheat bran by fermentation

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Crude fiber	N-free extract
	% dry matter					
Wheat bran	15.25	17.52	2.71	4.65	8.35	66.76
Fermented wheat bran	14.06	20.17	2.87	7.01	13.49	55.31

체중의 두배량에 해당하는 증류수에 담긴 상태로 15psi의 압력에서 1시간동안 autoclaving 처리를 하였고 waring blender로 2분동안 均質化한 후, 이 液狀의 sample을 1~1.5g 정도 채취하여 Kjeldahl¹⁷⁾ 방법의 의해 窒素함량을 定量하였다.

모든 試驗結果는 One way analysis에 의해 분산분석을 실시하였고, 각 평균간의 유의성은 Tukeys test³²⁾로 검정하였고 P < 0.05 수준과 P < 0.01 수준에서 비교하였다.

結果 및 考察

1) 醱酵飼料製造

밀기울 및 醱酵밀기울의 一般成分을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 一般成分中 醱酵밀기울은 밀기울에 비하여 粗단백질, 粗섬유, 粗회분이 증가하였고 粗지방은 거의 변화가 없었으며, 可溶性 無窒素物은 감소하였다.

醱酵밀기울에서 粗단백질과 粗회분이 증가한 것은 *Aspergillus oryzae* 培養中 原料의 절대량이 15% 정도 減少되었으므로 상대적으로 增加된 것으로 볼 수 있으며 조단백질함량이 많아진 것은 또한 微生物 단백질의 증가와도 관련될 수 있다고 본다. 粗섬유가 증가한 것은 *Aspergillus oryzae*가 cellulase를 분비하지만 그 분해력이 미약하기 때문에 原料의 乾物量 자체가 감소하는데 주로 기인하는 것으로 생각된다. 이와는 반대로 可溶性 無窒素物이 醱酵밀기울에서 原料보다 감소하였는데 이것은 微生物이 발육하는데 필요한 에너지源으로 이용되어 CO₂, H₂O 및 다른 물질로 揮散되거나 다른 물질의 合成에 이용된 것으로 사려된다.

Amino-nitrogen과 vitamin B₂ 함량은 Table 4와 같이 밀기울에 비하여 醱酵밀기울에서 각각 3.6 배 및 12 배 정도로 증가하였다.

Amino-nitrogen은 粗단백질에 포함되는 것으로서 이의 측정은 微生物이 분비하는 protease에 의해, 粗단백질이 분해되어 유리아미노산 함량이 어느 정도 증가되었는지를 알 수 있으며, 또한 amino-nitrogen의 생

Table 4. Changes in content of amino-nitrogen and riboflavin of wheat bran by fermentation

	wheat bran	Fermented wheat bran	% increase
	mg/100g dry matter		
Amino-nitrogen	54.64	249.76	357
Riboflavin	0.08	1.02	1175

성은 原料에 비해 소화 흡수가 容易한 형태로 된 것으로 볼 수 있다.

밀기울 및 醱酵밀기울의 構成아미노산을 定量한 결과는 Table 5와 같다. Tryptophan을 제외한 7종의 필수아미노산을 비롯하여 17종의 아미노산을 精詳하였다. 醱酵밀기울의 총 아미노산함량 14.76% 중에서 필수아미노산이 차지하는 비율은 33.26%로, 이것은 原料 밀기울의 총 아미노산함량 12.45%中 필수아미노산이 차지하는 비율 29.63%에 비해 4% 가까이 증가하였다.

이와같이 醱酵밀기울에서 아미노산함량의 증가는 *Aspergillus oryzae*가 밀기울의 蛋白態 窒素化合物 및 非蛋白態 窒素化合物을 同化하여 菌體 단백질로 合成하였기 때문일 것이며, 또한 微生物 培養中 밀기울의 可溶性無窒素物 함량의 감소에 따른 反비례적인 증가분도 상당히 있을 것으로 본다.

밀기울에 *Aspergillus oryzae*를 接種하고 incubator에서 48시간 培養시켜 攪진시킨 후 protease, α-amylase, β-amylase의 力價를 측정한 결과는 Table 6과 같다.

2) 動物 飼育 試驗

(1) 飼料 섭취량, 체중 증가량, 飼料効率

Table 7과 같이 각 飼料군에서 시험기간 동안의 총 飼料 섭취량은 거의 비슷하였으나 전반적으로 FWB군들이 50% WB군에 비해 약간 적은 傾向을 나타내고 있는데 이는 醱酵밀기울을 첨가함에 따라 기호성이 떨어졌기 때문인 것으로 짐작된다.

Table 5. Content of total amino acids of wheat bran and fermented wheat bran

Classification	Wheat bran	Fermented wheat bran	Amount increased by fermentation	% change
			% dry matter	
Aspartic acid ¹⁾	1.02	1.35	0.33	32.35
Threonine	0.47	0.71	0.24	51.06
Serine	0.63	0.83	0.20	31.74
Glutamic acid ²⁾	2.89	2.81	-0.08	-2.76
Proline	0.88	0.82	-0.06	-6.81
Glycine	0.75	0.83	0.08	10.66
Alanine	0.70	0.92	0.22	31.42
Cystine	0.19	0.21	0.02	10.52
Valine	0.65	0.85	0.20	30.76
Methionine	0.13	0.19	0.06	46.15
Isoleucine	0.43	0.59	0.16	37.20
Leucine	0.89	1.18	0.29	32.58
Tyrosine	0.30	0.42	0.12	40.00
Phenylalanine	0.55	0.66	0.11	20.00
Histidine	0.55	0.84	0.29	52.72
Lysine	0.57	0.73	0.16	28.07
Arginine	0.85	0.82	-0.03	-3.52
Total amino acids	12.45	14.76	2.31	18.55 ³⁾

- 1) Aspartic acid + Asparagine.
 2) Glutamic acid + Glutamine.
 3) $2.31 \div 12.45 \times 100 = 18.55(\%)$.

Table 6. Enzyme activities of fermented wheat bran

Enzymes	Activity Unit/ml
Protease	7.8
α -amylase	678
β -amylase	181.1

체중 증가량도 각 飼料군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았고 無窒素飼料군에서는 열흘동안의 시험기간 중 18.02g의 체중감소가 있었다.

또한 FWB군들이 50% WB군에 비해 비교적 飼料効率が 좋은 것으로 나타났으므로 醱酵飼料의 使用은 飼料의 利用性을 높히는 方法이 될 수 있다고 판단되며 이와 같은 결과는 여러 연구자들의 보고^{6-8, 10, 13-16, 33)}와 일치한다.

각 飼料군의 PER, NPR 및 NPU 수치들을 조사한 결과는 Table 8과 같다.

本 試驗結果 PER 수치에서는 100% Casein을 제외한 나머지 군간에 有意한 差異가 없는 반면에 NPR값에서는 FWB군들이 50% WB군에 비해 有意하지는 않지만 다소 높은 수치를 보였다. 이런 점에서 볼때 역시 NPR이 PER보다 더 예민한 방법이라고 생각된다.

NPU는 FWB군들이 전체적으로 그 범위가 36~43% 정도의 수준이어서 NPU가 25.6%인 50% WB군보다 높았는데, 이들 FWB군 중에서도 50% FWB군은 통계적으로 有意性을 나타내었고 ($p < 0.05$), 100% Casein군의 수치와 거의 유사하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이와같이 50% FWB군이 낮은 飼料効률에도 불구하고 醱酵밀기울을 첨가한 飼料 蛋白質의 이용이 현저히 증대된 점은 매우 흥미롭다. 이 결과는 아마도 밀기울의 식물성 단백질이 *Aspergillus oryzae*에 의하여 동물성 단백질인 菌體로 단백질의 質이 향상되었

Table 7. Feed intake and body weight gains of rats¹⁾

Dietary groups ²⁾	Feed intake	Body weight gain	Feed/gain
	g	g	g
100% Casein	124.4± 8.7a	38.3 ± 2.6a	3.24 ± 0.06a
50% WB	156.4± 14.5a	33.2 ± 3.1b	4.72 ± 0.10b
20% FWB	133.9± 10.2a	29.3 ± 3.2b	4.65 ± 0.24 b
30% FWB	145.0± 12.4a	33.4 ± 2.2b	4.31 ± 0.13b
50% FWB	124.3± 15.6a	26.7 ± 2.9b	4.69 ± 0.37b
N-free	50.1± 7.6b	-18.0 ± 2.9c	-

1) Initial body weight per rat was 92.5±1.1(S.E) Mean value±standard error.

Means with a common superscript are not significantly different (P < 0.05).

2) As in table 1.

Table 8. Carcass nitrogen, nitrogen intake and values of NPU, PER and NPR of diets containing various amounts of casein, wheat bran and fermented wheat bran in rats¹⁾

Dietary groups	Total nitrogen per carcass	Nitrogen intake per rat	NPU	PER	NPR
	g	g	%		
Initial	2.22±0.04c	-	-	-	-
N-free	2.01±0.03d	0.13b	-	-	-
100% Casein	2.79±0.01a	2.10 ± 0.14a	43.8±2.8a	2.91± 0.06a	4.31± 0.13a
50% WB	2.47±0.04b	2.35 ± 0.21a	25.6±2.4b	2.03± 0.06b	3.31± 0.12b
20% FWB	2.66±0.02a	2.07 ± 0.15a	38.2±3.1ab	2.23± 0.10b	3.66± 0.08ab
30% FWB	2.70±0.04a	2.29 ± 0.19a	36.4±2.9ab	2.35± 0.07b	3.66± 0.22ab
50% FWB	2.68±0.04a	1.99 ± 0.24a	42.6±5.3a	2.18± 0.19b	3.71± 0.31ab
Significance	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.05

1) Mean value ± standard error of rats fed diets for 10days.

Means with a common superscript are not significantly different.

으며 酵素 protease분비로 인해 소화 흡수가 容易한 형태로 변형된 것에 기인하는 것으로 추측되며, 이는 FWB군이 50% WB군에 비해 飼料効率が 약간씩이나마 더 좋아지는 경향이 있었고, NPU 등 단백질의 生物學的 利用性이 더 좋게 나타나는 경향이 보였던 것과 일치하는 것으로 생각된다.

以上的 결과에서 살펴본 바와 같이 *Aspergillus oryzae* 를 이용하여 醱酵시킨 밀기울을 飼料에 一部 첨가하는 것은 소화를 용이하게 하고 단백질의 質을 향상시켜 동물에서 蛋白質의 體內 利用을 높인다는 것을 알 수 있다.

要 約

飼料 蛋白質의 質을 향상시키기 위해 微生物을 培養하여 제조한 醱酵飼料의 質의인 改善效果를 알아보고자 밀기울에 *Aspergillus oryzae* 를 培養한 醱酵밀기울을 제조하여 그 化學的 組成과 동시에 飼料에 첨가한 후 사육하여 成長率과 飼料効率을 측정하였으며, NPU, PER 및 NPR과 같은 蛋白質의 生物學的 利用性을 조사하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 醱酵밀기울의 제조과정 중에 밀기울乾物의 절대

량이 15% 감소되었다.

2) 醱酵밀기울의 一般成分은 원료인 밀기울에 비해 粗단백질, 粗섬유, 粗灰分 및 粗지방은 증가하였고 可溶性無窒素物은 감소하였으며 amino - nitrogen 과 riboflavin의 함량은 각각 3.6배와 12배씩 현저히 증가되었다. 아미노산 함량은 醱酵밀기울에서 18.6% 증가하였다.

3) 쥐의 飼料 攝取量과 體重 增加量에서는 각 군간에 별다른 차이가 나타나지 않았으며, 飼料效率은 모든 FWB군이 50% WB군보다 좋았으나 통계적 有意性은 없었다.

4) 대체적으로 모든 FWB군은 50% WB군보다 PER, NPR 및 NPU 수치가 높은 傾向이었는데 그중 50% FWB군의 NPU 수치는 100% Casein 군과는 거의 유사하고 50% WB군에 비해서는 有意하게 더 높다($P < 0.05$).

REFERENCES

- 1) Biely, J. and March, B.: *Effect of enzyme supplement (agrozyme) on the growing of chickens. Feedstuffs.* 33(23):26, 1961.
- 2) 金浩植·曹惠鉉: 후라빈 生産性 *Aspergillus oryzae*의 人工突然變異種에 依한 醱酵飼料의 製造에 關한 研究. 韓國農化學會誌. 1:34-36, 1960.
- 3) Leong, K.C., Jensen, L.S. and McGinnis J.: *Effect of water treatment and enzyme supplementation on the metabolizable energy of barley. Poultry Sci.* 41(1):36-39, 1962.
- 4) Hall, H.H.: *Applied microbiology on animal nutrition. Advances in appl. microbiology.* 4: 77-99, 1962.
- 5) Schafer, A.E., Greene, R.D., Sassaman, H.L. and Wind, S.: *Fermentation meals as a source of unidentified chick growth factors. Poultry Sci.* 34: 851-855, 1955.
- 6) 金浩植·朴泰濬·全在根: 麹菌 醱酵飼料의 methionine合成에 關한 研究. 韓國農化學會誌. 5:1-5, 1964.
- 7) 鄭萬在·金奇哲·이택원: 微生物에 依한 醱酵飼料 加工 및 利用에 關한 研究. 과학기술처 R-71-100
- 8) 佐藤清次: 紫外線照射脫脂米糠의 養鷄에 對する 應用. 微生物飼料의 基礎と實際. pp. 90-92, 養鷄의 日本社, 日本, 1958.
- 9) 蔣潤煥·吳才變·金浩植: 醱酵飼料製造 試驗 I. 고구마 및 벗짚 koji 製造時 여러가지 添加物의 最適 水準究明. 農試研報. 6(3):61-65, 1963.
- 10) 申彥益·柳漢雄·蔣潤煥: 고구마 澱粉粕硫安麴의 産卵鷄 飼養試驗. 農試研報. 7(3):7-13, 1964.
- 11) 蔣潤煥·金浩植·曹惠鉉·朴泰濬: 고구마 澱粉粕의 koji 化에 있어서 優良菌株選擇試驗. 農試研報. 5: 188-193, 1962.
- 12) 蔣潤煥·吳才變·李宗遠·金浩植: 고구마 및 벗짚의 醱酵飼料製造試驗. 韓國畜産學會誌. 10(5):17-21, 1963.
- 13) 吳鳳國·姜禧信·金浩植·曹惠鉉: 中離飼料에 있어서 고구마 澱粉粕醱酵飼料의 飼養試驗. 서울대論文集(D).10:89-95, 1961.
- 14) 姜有聲·金春株: 옥수수 澱粉粕의 飼料價値 增進에 대한 연구. 韓國畜産學會誌. 12(4):297-301, 1970.
- 15) Joseph, M.R. and Victor, H.: *The value of corn fermentation condensed solubles as a growth stimulant for chickens. Poultry Sci* 38:26-30, 1959.
- 16) Simon, T.L., Tsang and Philip, J.S.: *The value of corn fermentation solubles in poultry nutrition. Poultry Sci* 39:251-257, 1960.
- 17) A.O.A.C.: *Official method of analysis of the association of official analytical chemists. 13th ed. Washington D.C., 1980*
- 18) 東京大學農藝化學教室: 實驗農藝化學, 別卷, pp.158, 朝倉書店, 東京, 1961.
- 19) 保健社會部: 大韓藥典(제2개정 제1부) pp.141, 1967.
- 20) Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S.: *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem.* 30:1190-1206, 1958.
- 21) 연세대 공학부 식품공학과: 식품공학실험서, pp 474-478, 탐구당, 서울, 1984.
- 22) 萩原文二, 江上: 標準生化學實驗. pp. 207, 日本, 1953.
- 23) 萩原文二, 赤堀: 酵素研究法 II, pp. 240. 朝倉書店, 日本, 1956.
- 24) 東京大學農藝化學部: 實驗農藝化學. 上卷. pp.283, 朝倉書店, 日本, 1968.
- 25) 片倉健二, 火田中干藏: 米麴의 酵素生産에 關する 研究(第1報). 原料의 吸收量と 酵素力との關係. 日本醸造協會誌. 54:88, 19.
- 26) 芳賀宏·伊藤美智子·蒙原孝志·佐久木重夫: 放線

- 菌酵素を利用した醬油醸造試験, 調味科學. 11:10, 1964.
- 27) Mitchell, H.H.: *Determination of the nutritive value of the proteins of food products. Ind. Eng. Chem. (analytical edition)*. 16:696-700, 1944.
- 28) Bender, A.E. and Doell, B.H.: *Biological evaluation of protein; a new aspect British J Nutr.*:140-148, 1957.
- 29) Bender, A.E. and Miller, D.S.: *New brief method of estimating net protein value. Biochem. J.* 53: VII - VIII, 1953.
- 30) Miller, D.S. and Bender, A.E.: *The determination of protein by a shortened method. Br. J. Nutr.* 9:382-385, 1955.
- 31) 池奎萬 · 趙鎮煥 · 姜冕熙: 식물성 단백질飼料의 병아리에서의 生物學的 利用性에 關한 연구. 韓國畜産學會誌. 24(3):253-259, 1982.
- 32) Steel, R.G. and Torrie, J.H.: *Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co., New York, 1960.*
- 33) 吳鳳國 · 崔竹松 · 金浩植: 中雛飼料에 있어서 酒精粕 酸酵飼料의 飼料的 利用에 關한 試驗. 서울大論文集(B), 14:8-15, 1963