

**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 특허공보(B1)**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
A21D 2/00

(45) 공고일자 1991년04월06일  
(11) 공고번호 91-002161

(21) 출원번호	특1984-0003404	(65) 공개번호	특1985-0000191
(22) 출원일자	1984년06월16일	(43) 공개일자	1985년02월26일
(30) 우선권주장	83-108847 1983년06월17일 일본(JP)		
(71) 출원인	교와 하꼬 고교 가부시끼가이샤 가도오 미끼오 일본국 도오꼬도 지요다꾸 오떼마찌 1쵸메 6-1		

(72) 발명자  
이노우에 세이지로  
일본국 도오꼬도 마찌다시 아사히마찌 3-6-6  
오따 시게노리  
일본국 도오꼬도 고마에시 이와도기따 3-6-17  
(74) 대리인  
이병호

**심사관 : 공민호 (책자공보 제2249호)**

---

**(54) 빵의 개선된 제조방법**

---

**요약**

내용 없음.

**영세서**

[발명의 명칭]

빵의 개선된 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 개량제를 이용하여 빵을 제조하는 개선된 방법 및 그에 이용되는 제빵 개량제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 글루타치온 분해효소를 함유하는 반죽(dough)을 제조한 다음, 통상적인 방법으로 제조한 반죽을 처리하여 빵을 제조함을 특징으로 하는 빵의 제조방법 및 글루타치온 분해효소를 함유하는 제빵 개량제에 관한 것이다.

빵은 훈합, 분할 및 성형 등의 기계적 조작을 통해 제조한다. 반죽의 물리적 성질, 즉 탄성, 신전성(伸展性), 비-점착성 및 성형력 등의 빵의 품질에 영향을 미친다. 이러한 물리적 성질들을 개선시킴으로써 빵의 품질을 향상시킬 수 있다. 빵의 품질은 맛, 향기, 식감, 부피 및 내부 구조와 같은 지표로 평가된다.

현재, 빵 반죽의 물리적 성질 및 빵의 품질을 향상시키기 위한 각종 제빵 개량제가 사용되고 있다. 예를 들어, 각종 유화제(예: 모노글리세라이드 및 칼슘 스테아릴 락틸레이트), 산화 환원제(예: 브롬산 칼륨 및 아스코르브산), L-시스틴, 프로테아제, 아밀라제 및 리파아제 등이 사용되고 있지만, 완전히 만족스런 제빵 효과를 얻을 수 없다.

본 발명자들은 종래에 우수한 제빵 개량제로서 포스포리파제 A를 함유하는 반죽을 통상적인 방법으로 처리하여 빵을 제조하는 방법에 대해서 출원하였다.[참조 : 1983년 11월 3일자로 출원된 일본국 특허원 제197098/1982호 및 미합중국 특허원 제548,514호]. 품질이 높은 빵을 얻기 위한 제빵 개량제는 항상 요구되어 왔다. 우수한 품질의 빵을 제조하기 위해 여러가지 개량제에 대한 연구가 시도되었으며, 본 발명에 이르러 글루타치온 분해효소가 빵의 품질에 대해 우수한 효과가 있음이 밝혀졌다.

본 발명은 하기에서 더욱 상세히 설명한다.

본 발명의 글루타치온 분해효소로는 글루타치온을 분해하는 효소라면 어느 것이라도 사용할 수 있다. 공지된 글루타치온 분해효소의 예로는 글루타치온 산화효소, γ-글루타밀 전이효소(EC 2.3.2.2.) 및 시스테이닐 글리신 디펩티다제(EC 3.4.13.6)가 있으며, 이들은 동물 조직이나 식물(예, 대두, 버섯 및 양파) 등에 널리 분포되어 있다.

동물의 기관, 예를 들어 돼지의 신장을 효소원으로 사용하는 경우, 사용전에 돼지 신장으로부터 지방을 제거하여 잘게 썰은 다음 야세톤으로 세척하여 건조시킨다.

글루타치온 분해효소의 첨가량은 밀가루의 품질, 요구되는 제빵 품질의 개량 정도, 빵의 종류, 빵의 제조방법 및 원료 배합 등에 따라 좌우된다. 일반적으로, 후술하는 참조 실시예 1에 나타나는 γ-글루타밀 전이효소 활성 표시법으로 밀가루 kg당 0.5 내지 20유니트(pH 5.5 및 30°C에서의 γ-글루타밀 전이 효소 활성도로 표시)를 사용한다.

글루타치온 분해효소는 일반적으로 반죽을 혼합할 때 가한다. 또 다른 방법으로, 효소를 밀가루, 또는 각종 보조성분을 함유한 제빵용 밀가루 혼합물과 혼합하는 방법이 있다. 이러한 대체 방법은 제빵하기 위해 성분들을 가할 때마다 매번 글루타치온 분해 효소를 평양하여 가할 필요가 없으며, 저장하는 동안 점차적으로 효소반응이 진행되어 빵의 품질이 개선되는 효과가 신장되는 장점이 있다. 이러한 장점이 본 발명의 또 다른 관점이다.

글루타치온 분해효소의 첨가에 따른 효과는 반죽의 물리적 성질 및 제빵 품질에서 명백해진다. 반죽은, 본 발명에 따르는 효소를 첨가하므로써 탄성이 증가되며, 점착성이 억제되고, 또한 성형시 반죽이 거칠어지는 것도 억제되어 각 단계에서 수행이 용이해진다. 본 발명의 효소를 기하면, 완제품은 부피가 증가되며, 빵의 내부는 잘 신장된 필름망을 가진 미세한 구조를 나타내면서 적당히 부드러워진다. 또한, 본 발명에 따르면, 빵을 저장하는 동안 빵의 노화가 억제된다.

특히 언급해야만 하는 본 발명의 제빵 개선 효과에 대한 또 다른 특징은 또한 본 발명에 따르는 효소를 단백질 함량이 12%미만이며, 제빵 적성이 낮은 저-단백 밀가루(예 : 일본산 밀가루)에 적용할 때 명백해진다. 상기와 같은 밀가루의 경우에는, 제빵에 있어서 상술된 바와 같은 우수한 결과를 기대할 수 있지만, 본 발명의 효소를 사용함으로써 상술된 개선효과가 발휘되며, 작업성과 제품 품질이 둘다 상당히 개선된다.

글루타치온 분해 효소와 병용할 수 있는 산화 환원제로는 브롬산 칼륨 및 아스코르브산이 있으며, 유화제로는 모노글리세라이드 및 칼슘 스테아릴 락틸레이트가 있고, 효소 제제의 예로는 포스포리파제 A가 있다. 일반적으로, 밀가루를 기준으로, 산화 환원제는 0.0005 내지 0.01%(w/w)를 사용하고, 유화제는 0.05 내지 0.5%(w/w)를 사용하며, 효소 제제는 밀가루 kg당 10 내지 400유니트를 사용한다.

본 발명에 따르는 제빵 개량에는 스푼지 및 반죽법 또는 직접 반죽법에 적용할 수 있다.

제빵 공정으로 스푼지 및 반죽법을 사용하는 경우는 글루타치온 분해효소 및 경우에 따라 포스포리파제 A, 유화제 또는 산화 환원제를, 밀가루와 빵효모를 주성분으로 하는 스푼지 혼합물 및 밀가루, 설탕 및 쇼트닝을 주성분으로 하는 반죽 혼합물중의 하나 이상에 가한다. 글루타치온 분해효소 및 포스포리파제 A를 스푼지 혼합물에 가하는 것이 바람직하다.

스푼지 및 반죽법에 의한 제빵 공정은 다음과 같다 : 밀가루와 빵 효모가 주성분인 스푼지 혼합물에 물을 가하여, 성분들을 혼합하고, 일반적으로 25 내지 35°C에서 2 내지 5시간동안 발효시킨다(스푼지 발효). 발효된 생성물을 밀가루, 설탕 및 쇼트닝이 주성분인 반죽 혼합물과 혼합한 다음, 혼합물을 물과 추가로 혼합하여 반죽을 제조한다.

반죽을 일반적으로 25 내지 35°C에서 10 내지 40분동안 방치한다(floor time). 다음에는 반죽을 일정크기로 나누어, 일반적으로 15 내지 35°C에서 10 내지 30분동안 방치한다(bench time). 계속해서 반죽을 성형하여 팬에 넣고, 일반적으로 35 내지 45°C에서 반죽이 예정 높이로 팽창될때까지 최종발효(재우기)시킨후, 180 내지 240°C에서 10 내지 30분동안 구어 빵을 제조한다.

직접 반죽법에 의한 제빵 공정은 다음과 같다 : 밀가루, 설탕, 쇼트닝 및 이스트푸드를 주성분으로 하는 반죽성분에 물을 가하여 혼합한 후, 혼합 생성물을 일반적으로 25 내지 35°C에서 60 내지 180 분동안 발효시킨다. 반죽을 일정크기로 나누어, 일반적으로 15 내지 35°C에서 10 내지 30분동안 방치한다(bench time). 계속해서 반죽을 성형하여 팬에 넣고, 일반적으로 35 내지 45°C에서 반죽이 예정 높이로 팽창할때까지 최종발효(재우기)시킨다. 다음에는 180 내지 240°C에서 10 내지 30분동안 구워 빵을 만든다.

양자의 방법에 의해 제조된 빵은 부피가 크며 적당히 연화되고, 빵의 내부는 필름형상의 잘 신장된 구조를 갖는다. 또한, 빵을 오랜 기간동안 지나치게 노화됨이 없이 저장할 수도 있다.

본 발명의 특정태양은 다음의 대표적인 실시예 및 참조실시예로 설명한다(실시예 및 참조실시예에서 %는 별도의 지시가 없는 한 중량%를 말한다).

#### [실시예 1]

본 실시예는 제빵에 있어서, 글루타치온 분해 효소(참조실시예 1에서 제조)의 강력분(단백질 함량 12.1%)에 대한 제빵 개선효과를 나타낸다.

다음 공정으로 빵을 제조한다 :

스푼지혼합물

강력분 350g	{
이스트푸드(아스코르브산 함유) 0.5g	
빵 효모 10g	

표 1의 글루타치온 분해효소

←물 200ml

↓  
혼합하기

↓  
스푼지 발효(28°C, 4시간)

| ←반죽혼합물

{ 강력분 150g  
 설탕 30g  
 소금 10g  
 탈지분유 10g  
 쇼트닝 20g  
 ←물 140ml

↓  
혼합하기

↓  
플로어 타임 (28°C, 20분)

↓  
분할하기

↓  
벤치타임(실온, 15분)

↓  
성형하기

↓  
재우기(40°C, 50분)

↓  
굽기(220°C, 25분)

↓  
빵

시험 그룹은 표1에 나타내었고, 제빵공정시 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 15°C에서 밀봉포장 중에 저장한지 2일 경과후 제품 품질에 대한 평가는 표2에 나타내었다.

[표 1]

시험그룹	첨 가 재	총밀가루에 대한 첨가제량(%) (units/kg 밀가루)
I	첨가하지 않음	
II	글루타치온-분해효소 (참조실시예 1에서 제조)	0.025 (0.92)
III	"	0.05 (1.83)
IV	"	0.1 (3.66)

[표 2]

	시험 그룹			
	I	II	III	IV
<b>반죽의 물리적 성질(1)</b>				
탄성	○	○	○	○
신전성	△	△	△	△
비-점착성	△	○	○	○
성형력	△	○	○	○
<b>빵의 품질</b>				
비용적(2)	4.51	4.55	4.66	4.70
내부구조의 필름신장력	△	○	○	○
내부구조의 조직	△	△	○	○
蓬피	○	○	○	○
상대적인 노화(3)	100	98	95	93

## 1. 평가기준(숙련가에 의한 관능평가)

매우양호 : ○

양호 : ○

보통 : △

불량 : ×

## 2. 비용적 : 평지씨 치환법으로 측정

## 3. 상대적인 노화 : 빵의 압착시험 계기로 측정하여, 100으로 정한 대조값과 비교하여 표시한다.

시험 그룹 II, III 및 IV의 순으로 글루타치온 분해효소의 첨가량을 증가시킴에 따라, 반죽의 물리적 성질, 비용적, 내부구조 및 노화방지에 관한 개선효과가 증가된다.

## [실시예 2]

본 실시예는 수입 저-단백 밀가루와 일본산 저-단백 밀가루에 대한 글루타치온 분해효소의 제빵 개선효과를 나타낸다. 실시예 1에서 사용된 강력분을 표 3의 밀가루 및 첨가제로 치환 사용하여 실시예 1의 방법과 유사하게 반복한다. 흡수율은 표 3에 표시된 정도이다.

제빵하는 동안 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 저장한지 2일후의 제품 품질에 대한 평가는 표 4에 나타내었다.

[표 3]

시험 그룹	밀 가 르		첨 가 제	총밀가루에 대한 첨가제량(%) (units/kg밀가루)	
	비단백질 함량(%)	흡수율(%)			
I 수입밀가루	10.1	58	첨가하지 않음		
II 수입밀가루	10.1	58	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조)	0.1(3.66)	
III 일본산 밀가루 A	9.5	60	첨가하지 않음		
IV 일본산 밀가루 A	9.5	60	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조)	0.1(3.66)	
V 일본산 밀가루 B	10.6	60	첨가하지 않음		
VI 일본산 밀가루 B	10.6	60	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조)	0.1(3.66)	

[표 4]

	시 험 그 룹					
	I	II	III	IV	V	VI
<b>반죽의 물리적 성질</b>						
탄성	X	O	X	O	X	O
신전성	O	O	O	O	O	O
비-점착성	X	O	X	O	X	O
성형력	X	O	X	Δ	X	O
<b>빵의 품질</b>						
비용적	4.05	4.21	4.10	4.36	4.24	4.45
내부구조의 필름신장력	X	O	X	O	X	O
내부구조의 조직	X	O	X	O	X	O
품미	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ
상대적인 노화	100	89	100	87	100	80

주) 평가방법 : 표 2의 경우와 같다.

수입 저-단백 밀가루 및 일본산 저-단백 밀가루는, 글루타치온 분해효소를 가하지 않은 경우 반죽의 물리적 성질과 제품 품질에서 매우 나쁜 결과를 나타낸다. 그러나, 글루타치온 분해효소 0.1%를 함으로써, 반죽의 훈합내성이 증가되며, 반죽이 다소 단단해지고, 비용적, 내부구조 및 노화정도가

상당히 개선된다. 이러한 저-단백 밀가루에 글루타치온 분해효소의 효과를 실시예 1에서의 강력분에 대한 효과보다 더 크다.

[실시예 3]

본 실시예는 글루타치온 분해효소를 기타의 개량제와 병용한 예로서, 제빵업계에서 널리 사용되고 있는 칼슘 스테아릴 락틸레이트(CSL) 및 본 발명자들이 발견했던 포스포리파제 A를 병용한 효과를 나타낸다. 포스포리파제 A제제로서, 돼지의 판크레아틴 포스포리파제 A(Sigma Co. 제품)를 사용한다. 밀가루는 강력분(단백질 함량 12.1%)을 사용한다. 실시예 1의 표 10에 표시된 글루타치온 분해효소를 표5의 첨가제로 치환 사용하여 실시예 1의 방법과 유사하게 반복한다.

제빵하는 동안 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 저장한지 2일후 제품 품질에 대한 평가는 표 6에 나타낸다.

글루타치온 분해효소만을 첨가하는 경우와 비교하면, 글루타치온 분해효소와 CSL 또는 포스포리파제 A를 병용하므로써, 반죽의 물리적 성질 및 제품 품질이 훨씬 향상된다. 특히, 비용적 및 노화방지에 대한 상승효과가 대단하다.

[표 5]

시험그룹	첨 가 제	총밀가루에 대한 첨가제량(%) (units/kg 밀가루)
I	첨가하지 않음	
II	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조)	0.1(3.66)
III	CSL	0.2
IV	포스포리파제 A	0.04
V	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조) CSL	0.1(3.66) 0.2
VI	글루타치온 분해효소 (참조실시예 1에서 제조) 포스포리파제 A	0.1(3.66) 0.04

[표 6]

	시험 그룹					
	I	II	III	IV	V	VI
<b>반죽의 물리적 성질</b>						
탄성	○	○	△	○	○	○
신전성	△	△	○	○	○	○
비-점착성	△	○	△	○	○	○
성형력	△	○	○	○	○	○
<b>빵의 품질</b>						
비용적	4.56	4.75	4.65	4.68	4.80	4.94
내부구조의 필름신장력	△	○	○	○	○	○
내부구조의 조직	△	○	○	○	○	○
풍미	○	○	△	○	△	○
상대적인 노화	100	93	88	89	79	77

주) 평가방법 : 표 2의 경우와 같다.

#### [실시예 4]

본 실시예는 밀가루에 대한 첨가의 예를 나타낸다. 실시예 1에서 표 10에 표시된 글루타치온 분해효소 및 스폰지 혼합물의 강력분을, 표 7의 글루타치온 분해 효소를 함유하는 강력분으로 치환 사용하여 실시예 1과 유사한 방법으로 반복한다.

제빵하는 동안 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 저장한지 2일후 제품 품질에 대한 첨가는 표 8에 나타낸다.

[표 7]

시험그룹	첨 가 제
I	첨가하지 않음
II	참조실시예 1에서 제조된 글루타치온 분해효소 0.05%(1.83units/kg 밀가루)를 함유하는 강력분
III	참조실시예 1에서 제조된 글루타치온 분해효소 0.1%(3.66units/kg 밀가루)를 함유하는 강력분

[표 8]

	시 험 그 룹		
	I	II	III
<b>반죽의 물리적 성질</b>			
탄성	○	◎	◎
신전성	△	△	△
비-점착성	△	○	◎
성형력	△	○	◎
<b>빵의 품질</b>			
비용적	4.46	4.58	4.64
내부구조의 필름신장력	△	○	◎
내부구조의 조직	△	○	○
蓬미	○	○	○
상대적인 노화	100	96	93

주) 평가방법 : 표 2의 경우와 같다.

실시에 1에서 글루타치온 분해효소를 분리 첨가하는 경우와 유사하게, 시험그룹 II 및 III에서는 시험그룹 I과 비교하여 반죽의 물리적 성질 및 제품 품질이 개선된다.

#### [실시예 5]

본 실시에는, 글루타치온 분해효소를 사용한 예로서, 참조실시에 1에서 제조된 글루타치온 분해 효소를 가하여 표 9에 나타낸 성분의 혼합물을 제조한다. 표 9에 나타낸 성분의 혼합물중, 글루타치온 분해 효소를 제외한 것을 시험대조용으로 사용하여 직접 반죽법으로 빵을 제조한다.

제빵하는 동안 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 저장한지 2일후 제품 품질에 대한 평가는 표10에 나타낸다.

[표 9]

	혼합비(%)
강력분	87.55
정제설탕	4.00
소금	1.75
쇼트닝	4.00
이스트푸드(아스코르보산 함유)	0.10
분유	2.00
탈지 대두분	0.50
글루타치온 분해효소(참조실시에 1에서 참조)	0.10

[표 10]

	시험대조	시험그룹(표 9에 표시된 성분이 혼합물)
<b>반죽의 물리적 성질</b>		
탄성	○	○
신전성	△	△
비-검착성	△	○
성형력	△	○
<b>빵의 품질</b>		
비용적	4.44	4.60
내부구조의 필름신장력	△	○
내부구조의 조직	△	○
풍미	○	○
<b>상대적인 노화</b>	100	94

주) 평가 방법 : 표 2의 경우와 같다.

직접 반죽법의 경우에서도 스푼지 및 반죽법의 경우에서와 마찬가지로 참조실시예 1에서 제조된 글루타チ온 분해 효소를 포함한 표 9에 있는 성분의 혼합물을 사용함으로써, 대조군과 비교하여 반죽의 물리적 성질 및 빵의 품질에서 더 좋은 결과를 얻는다.

#### [실시예 6]

본 실시예는 글루타チ온 분해 효소의 작용에 의해 생성된 L-글루탐산, L-시스틴 및 글리신이 빵의 제조에 미치는 영향을 나타낸다. 밀가루로서 강력분(단백질 함량 12.1%)을 사용하여, 실시예 1의 표 1에 나타난 글루타チ온 분해 효소를 표 11의 첨가제로 치환 사용하여 실시예 1의 방법과 유사하게 반복한다.

제빵하는 동안 반죽의 물리적 성질에 대한 평가 및 저장한지 2일후 빵의 품질에 대한 평가는 표 12에 나타낸다.

L-글루탐산 및 글리신을 사용하는 경우에는 제빵에 대한 개선효과가 관찰되지 않는다. L-시스틴의 경우에는, 비용적 및 내부구조에 대해 약간의 개선효과가 관찰되지만, 반죽의 물리적 성질은 개선되지 않으며, 개선효과는 글루타チ온 분해 효소와 비교하여 더 적다.

[표 11]

시험그룹	첨 가 제	총밀가루에 대한 첨가제량 (ppm)
I	첨가하지 않음	
II	글루타치온 분해효소 (대조실시예 1에서 제조)	1000 (3.66units/kg 밀가루)
III	L-글루탐산	20
IV	L-시스틴	20
V	글리신	20
VI	L-글루타민 L-시스틴 글리신	20 20 20

[표 12]

	시 험 그 룹					
	I	II	III	IV	V	VI
<b>반죽의 물리적 성질</b>						
탄성	○	○	○	○	○	○
신전성	△	△	△	△	△	△
비-점착성	△	◎	△	△	△	△
성형력	△	◎	△	△	△	△
<b>빵의 품질</b>						
비용적	4.55	4.71	4.53	4.64	4.55	4.66
내부구조의 필름신장력	△	◎	△	○	△	○
내부구조의 조직	△	○	△	△	△	△
풍미	○	○	○	○	○	○
상대적인 노화	100	93	101	98	99	97

주) 평가방법 : 표 2의 경우와 같다.

참조실시예 1(글루타치온 분해효소의 제조방법)

지방을 제거한 돼지 선창 500g을 얇게 썰어, -20°C로 냉각된 아세톤 2.5l를 가한 다음 10분동안 균질화한다.

균질물을 흡입 여과하고, 잔사를 -20°C로 냉각된 아세톤 3l(총 부피)를 사용하여 수회 세척한후 흡입 여과한다. 세척한 잔사를 진공중에 건조시켜 분말로 만든다. 따라서 돼지 신장 500g으로부터 조효소분말 84.4g을 수득한다.

[γ-글루타밀 전이효소 활성의 측정]

글루타치온 분해활성은 글루타치온 분해에 대한 주효소인 γ-글루타밀 전이효소의 활성으로 나타낼

수 있다.

본 활성 측정법은  $\gamma$ -글루타밀-P-니트로 아닐리드를 기질로 사용하여 효소와 반응시키고, 효소 반응으로 생성된 P-니트로아닐린을 410nm의 파장으로 비색정량하는 것이다.

본 참조실시예에서 제조된 조효소 분말을 0.01 내지 0.2%의 농도로 물중에 분산시켜 수득한 효소 분산액 1mI를 30°C에서 5분동안 예비 가온시킨다. 그런 다음에는, 기질[10mM  $\gamma$ -글루타밀-P-니트로아닐리드/0.2M 아세트산염 완충액(pH 5.5) 또는 0.2M 트리스-염산염 완충액(pH 9.0)] 1mI도 또한 30°C에서 예비 가온시켜 효소 분산액에 가하고, 30°C에서 pH 5.5 또는 pH 9.0에서 효소 반응을 수행한다. 정확히 10분후에 20% 아세트산 2mI를 가하여 반응을 정지시킨다. 원심분리한 후, 생성된 P-니트로아닐린을 410nm의 파장에서 비색 정량한다.

$\gamma$ -글루타밀 전이효소 활성은 유니트로 나타내며, 1 유니트는 1분에 P-니트로아닐린 1  $\mu$ 몰을 생성하는 효소량으로 정의된다.

본 발명에 따른 효소 제제의  $\gamma$ -글루타밀 전이 효소 활성도는 표 13에 나타낸다.

[표 13]

반응조건	$\gamma$ -글루타밀전이효소 활성도(unit/g)
pH 5.5-30°C	3.66
pH 9.0-30°C	61.2

[효소제제에 의한 글루타치온 분해의 확인]

본 발명에 따른 효소제제의 글루타치온에 대한 반응성은, 기질로서의 환원형 글루타치온을 효소와 반응시킨 후, 박층 크로마토그라피로 효소 반응 생성물을 분리하여, 닌하드린으로 발색시켜 분석한다.

본 참조실시예에서 제조된 조 효소분말을 0.2 내지 4%의 농도로 1/30M 아세트산염 완충액(pH 5.5)에 분산시킨다. 분산액 1mI에 기질[4mM 환원된 글루타치온/1/30M 아세트산 염 완충액(pH 5.5)] 1mI를 가하여, 30°C, pH 5.5에서 효소반응을 수행한다. 4시간 경과후, 끓는 물중에서 10분동안 가열시켜 반응을 중지시킨다. 그런 다음에, 반응 혼합물을 2  $\mu$ I를 실리카겔 박층판에 점적하여, n-부탄올-피리딘-물(1:1:v/v)로 전개시킨다. 전개가 끝나면, 판을 공기중에서 건조시키고, 닌하드린 시약을 사용하여 발색시킨다. 각 스포트(spot)를 표준 아미노산 시약을 사용하여 확인한다.

본 발명에 따른 효소 제제의 환원형 글루타치온 분해 활성도는 표 14에 나타낸다.

표 14에서 보는 바와 같이, 1%의 효소농도(효소/기질의 중량비 : 8.2), pH 5.5 및 30°C에서 4시간 동안의 반응으로, 환원형 글루타치온은 글루타치온 산화 효소,  $\gamma$ -글루타밀 전이효소 및 시스테인 글리신 디펩티다제의 작용에 의해 아미노산, 즉 L-글루탐산, L-시스틴 및 글리신으로 완전히 분해된다.

[표 14]

시험그룹	첨가제	총밀가루에 대한 첨가제량 (ppm)
I	첨가하지 않음	
II	글루타치온 분해효소 (대조실시예 1에서 제조)	1000 (3.66units/kg 밀가루)
III	L-글루탐산	20
IV	L-시스틴	20
V	글리신	20
VI	L-글루탐산 L-시스틴 글리신	20 20 20

주) 기호 설명

+++ : 다양 검출됨

++ : 검출됨

+ : 미량 검출됨

- : 검출되지 않음

## 참조실시예 2(밀가루중의 글루타치온 분석)

본 참조실시예는 밀가루중의 글루타치온 분석방법 및 글루타치온 분해효소의 밀가루 반죽에서의 글루타치온 분해 활성에 대해서 기술하고 있다.

## [밀가루중의 글루타치온 분석법]

이 분석 방법은 밀가루로부터 글루타치온을 추출하여 환원시킨 다음, 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산)과 반응시키고, 분리하여 고성능 액체 크로마토그라피로 정량적으로 측정함을 특징으로 한다.

먼저, 0.2M 염화나트륨 3ml를 밀가루 1g에 가한다. 혼합물을 5분간 교반시켜 추출하고, 원심분리하여 잔사를 제거한다. 0.2M 디티オス레이탈[0.5M 인산염 완충액(pH 8.0)중의 용액] 20μl를 상등액 1ml에 가한 다음, 실온에서 산화형 글루타치온을 환원시키고, 0.2M 5,5'-디티오-비스-(2-니트로벤조산)[0.5M 인산염 완충액(pH 8.0중의 용액] 0.1ml를 가하여, 환원형 글루타치온과 반응시킨다. 반응이 완결된 후, 2.5% 황산아연 0.5ml 및 0.15N 수산화바륨 0.5ml를 침전물에 가하여 부수적으로 추출된 단백질을 제거한다. 그런 다음에는, 단백질이 제거된 상등액 1ml에 포름산 80μl를 가한다. 교반한 후, 반응하지 않은 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산)을 추출하여, 수-포화 에틸 아세테이트 1ml로 세척한다. 수-포화 에틸아세테이트로 세척하는 과정을 4번 반복한다. 세척된 수성층 부분에서 10μl를 취하고, 고성능 액체 크로마토그라피를 사용하여 글루타치온을 분리 정량한다. 또한, 표준 글루타치온 용액을 제조하여 유사하게 처리한 후 검정곡선을 작성한다. 고성능 액체 크로마토그라피 NUCLEOSIL 10-C<sub>18</sub> 칼럼(4.6×250mm) 및 이동상으로서 0.025M 암모늄 포르메이트-메탄올(9 : 1)을 사용하여 수행한다.

본 방법으로 측정한 밀가루중 글루타치온의 함량을 표 15에 나타낸다.

[표 15]

밀가루	글루타치온 함량(ppm)
일본산 밀가루 A	32.5
일본산 밀가루 B	43.6

## [밀가루중에 존재하는 글루타치온에 대한 효소 제제의 분해활성]

밀가루중에 존재하는 글루타치온에 대한 글루타치온 분해 효소 제제(참조실시예 1에서 제조)의 분해 활성을 조사하기 위해, 밀가루 반죽을 제조하여 글루타치온 함량을 측정한다.

밀가루 반죽은 밀가루 50g에 물 30ml 및 참조실시예 1에서 제조된 조 효소분말 50mg(밀가루를 기준으로 0.1%)을 가하고 2분동안 혼합하여 제조한다. 반죽은 혼합한 즉시 냉동 전조시키거나, 30°C에서 4시간 동안 방치한 후에 냉동건조시켜, 상술된 방법으로 글루타치온에 대해서 분석한다.

글루타치온 분해 효소를 함유하는 밀가루 반죽의 글루타치온 분석 결과는 표 16에 나타낸다.

표 16에서 보는 바와 같이, 글루타치온 분해 효소를 첨가하는 경우에도, 30°C에서 4시간동안 반응시키지 않을 때는 글루타치온이 거의 분해되지 않으나, 밀가루에 존재하는 글루타치온의 약 70%가 분해되는 것을 알 수 있다.

[표 16]

	글루타치온 분해효소	30°C에서 4시간동안 반응	글루타치온 함량[ppm]
밀가루	-	-	32.5
반죽	-	-	34.1
	+	-	30.2
	-	+	27.9
	+	+	8.8

## (57) 청구의 범위

**청구항 1**

반죽의 성분에 글루타치온 분해 효소를 가한 후, 반죽을 이겨 효소와 반죽을 혼합하고, 계속해서 반죽을 빵으로 제조하는 공정을 포함함을 특징으로 하는, 빵의 제조 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 반죽을 빵으로 제조하는 공정에, 글루타치온 분해 효소를 함유하는 반죽을 분할하고, 성형하고, 재우고, 굽는 단계가 포함되는 방법.

**청구항 3**

밀가루 kg당 글루타치온 분해효소 0.5 내지 20유니트를, 밀가루, 빵 효모 및 물을 포함하는 빵 반죽의 성분과 혼합한 후, 생성된 혼합물을 이겨 탄성이 개선되고, 점착성이 억제되며, 성형시에 반죽이 거칠어지는 것이 방지되는 빵 반죽을 제공함을 특징으로 하는, 빵의 제조 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 이긴 반죽을 충분한 시간동안 방치하여 발효시킴으로써 예정 높이까지 부풀게 한 후, 승온에서 빵 반죽을 굽는 단계가 추가로 포함되는 방법.