KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 28, No. 6, pp. 1089~1094(1996)

Tyrosinase 저해제가 검은툭눈붕어의 멜라닌 생성에 미치는 영향

한대석 · 정승원 · 김석중 · 김상희 · 안병학
한국식품개발연구원

Effect of Tyrosinase Inhibitors on the Melanogenesis of Gold Fish (Jet Black Color)

Daeseok Han, Sung-Won Jung, Seok Joong Kim, Sang Hee Kim and Byung-Hak Ahn
Korea Food Research Institute

Abstract

The *in vivo* effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis of gold fish (jet black color) was evaluated by measuring surface color and observing melanin pigment. The fish was firstly cultivated in 0.9% NaCl solution for 1 week to induce melanogenesis, and then, it was transferred to each treatment group containing tyrosinase inhibitor. The fish was grouped into control, food additive group (addition of 5 mM glutathione, 5 mM cysteine, and 1 mM benzoic acid), microbial inhibitor group (addition of culture broth of *Aspergillus oryzae* in shiitake and glucose medium), and plant extract group (addition of the mixed extracts of green tea, beet, red chicory, and nameko). After 6 days, the fish was anesthetized by electric shock, and color of pectoral region, lateral region, and dorsal fin was measured. Hunter's L and b values of treated groups were generally higher than those of control group, indicating that the tyrosinase inhibitors could inhibit the melanogenesis of the fish. Effect of plant extract was apparent, though relatively weak, not because it did not work *in vivo*, but because a sufficient amount of extract could not be added to fish globes. If a large amount of extract was added, fish gradually died due to a microbial contamination. Micrscopic observation of melanin in lateral scale and dorsal fin showed that in the treated groups with tyrosinase inhibitors, the number of melanophore per unit area and the size of one melanophore decreased.

Key words: melanin, tyrosinase, inhibitor, gold fish (jet black color)

서 론

Melanin은 동·식물과 미생물계에 널리 존재하는 고분자의 천연 색소로 생물체에 따라 다양한 종류가 알려져 있으며, 포유동물의 경우 효소반응과 자발적 산화에 의해 생합성되는 melanin을 알카리 용해도 및 발색특성에 따라 eumelanin과 phaeomelanin으로 구분하거나, 물리적, 화학적으로 특성이 유사한 trichochrome을 포함하여 크게 3종류로[1] 분류하고 있으나 생합성 경로는 모두 tyrosine을 출발물질로 하여 tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine: oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)에 의해 촉매되는 dopaquinone을 거쳐 합성이 이루어지며 이후 아미노산 혹은 단백질과의 중합반응에 의해 최종적으로 melanin이 합성된다[2,3].

사람에 있어서 이 색소는 인종에 따라 신체의 피부색을 결정지우는 한 요소가 되고 있다. 그런데, 특정 피부색의 사람이라도 황인종과 백인종에 있어서 신체의 건강상태에 따라 주로 얼굴의 눈밑 또는 뺨에 특이적으로 짙은 반점을 형성하기도 하고 또한 노인의 경우에는 얼굴, 팔, 다리에 검버섯을 형성하기도 한다. 이들 기미나 노인성 홍반은 누구나 매우 싫어하는 증상이어서 의학계나 화장품업계에서는 이를 치유하기 위한 여러 노력을 기울여 왔다.

Melanin 생합성 과정에는 한가지 효소만이 유일하게 관여하므로 melanin 합성을 억제하는 방법으로 화장품 업계에서는 tyrosinase 저해제를 탐색하고 응용하여 왔다. 이런 저해제로는 cinnamic acid, benzoic acid, cysteine, chlorogenic acid, 4-hexylresorcinol 등이 알려져 있으며[4], 주로 여성의 기미 치유를 위하여는 인체의 hyper-pigmentation 치료에 사용되는 4-hy-

Corresponding author: Daeseok Han, Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

droxyanisole, hydroquinone을[5] 비롯하여, melanostatin, tropolone, kojic acid, arbutin 등이[6-9] 사용되어 왔으며 국내에서도 미생물 유래의 새로운 저해제를 발굴하여 왔으나[10] 안전성과 경제성 등의 문제점이 있는 경우가 많고 효과도 명확하거나 뚜렷하게 확인되고 있지는 못한 실정이다.

본 실험실에서는 식품을 통하여 기미나 노인성 검버섯 증상을 자연스러이 치유할 수 있는 방법을 모색해 보고자 tyrosinase의 저해제를 식용식물체, 천연의 식품첨가물로부터 탐색한 바 있고[11], *Aspergillus oryzae*를 표고버섯 추출물과 포도당을 배지로 발효시켜 tyrosinase 저해제를 생산한 바 있다[12]. 따라서 본 연구에서는 이들 물질을 생물체에 적용시켰을 때 실제 melanin 색소의 농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 온몸이 melanin 색소로 이루어진 검은툭눈붕어(*Carassius auratus*, gold fish, jet black color)를 이용하여 효능평가를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 식물체는 시중에서 구입하여 사용하였다. 검은툭눈붕어는 시중에서 구입하였으며 실험 때마다 크기가 비슷한 것을 선별하여 사용하였다.

시약

Mushroom tyrosinase (EC 1.14.18.1; 4,400 units/mg solid) 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), L-cystein, glutathione, benzoic acid, melanin 등의 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

식물체 시료의 제조

설록차(억수, 태평양) 120 g을 끓는물에서 10분간 우려내고 거즈로 걸러내 녹차 추출물을 얻었다. 무 500 g, 팽이버섯 500 g, 레드치커리 500 g을 수세하여 잘게 절단하고 여기에 증류수 1.5 *l*를 가하여 Waring Blender로 마쇄한 후 여과포로 여과하여 착즙액을 제조하였다. 이 착즙액에 열을 가하여 끓기 시작하면 즉시 냉각시키고 60 mesh의 표준체에 통과시켜 엉긴 덩어리를 제거한 후 평균입자경이 16 micron인 여과지와 2 micron인 여과지로 2차에 걸쳐 여과하였다. 이 청징액에 HCl을 가하여 pH를 7.0으로 조절한 후 어항에 첨가하였다.

Tyrosinase 활성 저해능 측정

저해제의 tyrosinase 활성 저해능 측정은 35°C 수조에서 온도를 미리 조정한 0.175 M phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 m*l*, 5 mM L-DOPA solution 0.2 m*l* 및 추출시료 용액 0.5 m*l*의 혼합액에 mushroom tyrosinase (11 units/m*l*) 0.1 m*l*를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시키면서 475 nm에서 시간에 따른 흡광도 변화를 계산한 값(S_{Abs})과 효소액 대신에 증류수 0.1 m*l*를 첨가하여 흡광도 변화를 계산한 값(B_{Abs}), 추출시료 용액 대신에 증류수 0.5 m*l*를 첨가하여 흡광도를 계산한 값(C_{Abs})을 측정하여 다음 식에 의해 계산하였다. Tyrosinase 저해 활성은 50%의 저해 효과를 나타내는 저해제의 양을 1 unit로 정의하였다.

$$\text{Inhibition effect}(\%) = \left\{1-\left(\frac{S_{Abs}-B_{Abs}}{C_{Abs}}\right)\right\} \times 100$$

검은툭눈붕어를 이용한 tyrosinase 저해제의 효능평가

수돗물을 받아 클로린과 암모니아가 반응하여 생성되는 chloramine과 유해 중금속을 중화하는 Aquarium conditioner (Fin care, Hagen Korea Co., product of USA)를 첨가하여 2일간 방치한 물에 검은툭눈붕어를 넣고 2일간 적응시킨 후 NaCl이 0.9%가 되도록 첨가하였다[13]. 일주일 후 상기한 대로 처리한 물로 붕어 표피의 소금기를 제거한 후 각 11~12 마리씩을 수돗물을 사용한 대조구, glutathione, cysteine, benzoic acid가 각각 5, 5, 1 mM씩 첨가된 식품 첨가물 처리구, 미생물 유래의 저해제가 첨가된 처리구, 식물체 추출물을 1,000 m*l*/30 *l* 첨가된 처리구에 넣고 양식하였다. 검은툭눈붕어의 먹이로는 Tetra pond floating stick (Tetra Werke, Germany)을 일일 주야로 2회 붕어 한 마리당 2개씩 공급하였고 아침에 UV 등을 켜주고 저녁에는 소등하였다. 식물체 처리구 어항의 물은 미생물이 오염되어 검은툭눈붕어가 죽게되므로 어항 바깥에 가열수조와 냉각수조를 설치하여 어항의 물을 관속으로 계속 순환시키면서 살균하고 다시 냉각하여 공급하였다. 각 어항의 검은툭눈붕어를 6일간 양식한 후 각각을 꺼내어 110V의 전기로 충격을 주어 마비시키고 가슴 (pectoral region), 측선 부위(lateral region) 비늘, 등지느러미 부위(dorsal fin)의 색을 색도계(Chroma meter CR-200, MINOLTA, Japan)로 측정하였다. 색도는 L, a, b 모두 측정되었으나 a 값은 적색도를 나타내는 지표로 본 연구 결과와 관련성이 낮으므로 제외하고 L과 b 값만을 표시하였다.

또한 측선이 있는 비늘 중 아가미 뒤로 세 번째 비

Table 1. Effect of tyrosinase inhibitors on the surface color of gold fish (jet black color)

	Treatment Color	Control group (8)[1]	Food additive group (9)	Microbial inhibitor group (8)	Plant extract group (11)
Lateral region	L	25.77±2.58[2]	32.81±5.65	29.04±4.33	26.13±4.66
	b	6.43±4.25	16.71±6.07	12.47±5.47	7.31±3.86
Pectoral region	L	47.74±6.82	56.99±7.15	53.88±5.22	49.98±8.39
	b	29.24±6.59	33.62±4.80	34.32±6.94	32.43±8.55
Dorsal fin	L	21.32±3.12	27.09±4.51	21.28±1.67	23.83±3.09
	b	-0.54±1.71	10.48±6.48	2.45±2.76	4.38±3.60

[1]Number of fish
[2]Mean±SD

늘과 등지느러미의 일정 부위를 절취하여 현미경(Microphot-FX, Nikon, Japan)으로 melanin을 관찰하였다.

Melanin 함량 분석

측선 바로 위, 측선이 있는 부위 및 측선 바로 아래 부위의 비늘을 취하고 등과 꼬리지느러미를 절취하여 동결건조시켜 melanin 함량 분석에 사용하였다. 동결건조된 측선비늘은 그대로, 등과 꼬리지느러미는 막자사발로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 준비된 각 시료의 250 배(v/w)에 해당하는 1 N NaOH를 가하여 15분간 혼합하면서 중탕가열(100℃)한 다음 냉각시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였으며, melanin 표준곡선은 합성 melanin 시약을 시료로 하여 동일한 조건에서 농도별로 흡광도를 측정하여 작성하였다[14].

결과 및 고찰

Tyrosinase는 polyphenol oxidase (PPO)와 같은 효소로서 단지 기질에 따라 dihydroxy phenol에 작용하면 PPO, monophenol에 작용하면 tyrosinase라고 불리운다. PPO가 식품의 효소적 갈변을 촉매하여 품질의 열화를 유발하는 작용은 잘 알려져 있으며 이를 방지하기 위한 PPO 저해제는 coumaric acid 등 여러 가지가 알려져 있다[15]. 이들 저해제는 tyrosinase의 저해제라고도 할 수 있으나 기질이 달라짐에 따라 저해제의 저해활성이 PPO의 경우와 일치하지는 않는다. 따라서 tyrosine으로부터 melanin이 생합성되는 과정의 중간 산물인 L-DOPA를 기질로 사용하고 식용 가능한 식물체와 식품첨가물을 대상으로 tyrosinase의 저해제를 탐색하였다. 이들이 생체내에서 melanogenesis 억제 효능을 나타내는지 여부를 알아보기 위하여 비교적 저해활성이 높게 나타난 첨가물 또는 식물체 추출액을 제조하였다. 마늘이나 홍고추의 저해활성도 높았지만 본 실험에 사용할 수 없었는데, 그 이유는 이들 식물체 추출물을 검은툭눈붕어에게 공급하면 이들의 매운맛 성분 때문인지 붕어가 점차 죽어가는 현상을 나타냈기 때문이었다.

검은툭눈붕어를 이용한 melanogenesis 억제 효과 측정에는 붕어를 0.9%의 NaCl 용액에서 양식한 후 사용하는데 소금 용액에서 붕어는 stress를 받아 melanin 농도가 높아지며 육안으로도 검은색이 짙어진 것을 판별할 수 있다. 단, 원래 상태의 붕어와 소금물에서 양식한 검은툭눈붕어의 색은 측정할 수 없었는데 이는 시료에 전기 충격을 가할 수도 없고 색도 측정을 위해 붕어를 손으로 쥐고나면 붕어가 stress를 받아 이후 점차 죽어가기 때문이었다.

실험에 사용한 tyrosinase 저해제의 효소 저해활성을 측정한 결과 *Aspergillus oryzae* 배양액의 tyrosinase 저해활성은 1,000 unit/ml였으며, 녹차, 무, 레드 치커리, 팽이버섯 등 4종의 식물체 추출액의 tyrosinase 저해능은 4 unit/ml였다. 한편, 어항에 각 저해제를 microbial inhibitor는 3,000 unit/l의 농도로, 식물체 추출물은 135 unit/l의 농도로, 식품첨가물은 10,000 unit/l의 농도로 첨가하였다. 저해제 농도를 달리한 이유는 식물체 추출물의 경우 대량으로 첨가하면 미생물 오염이 심각하여 붕어의 사망 원인이 되고 또한 갈변이 심하여 빛이 잘 투과되지 않아 다른 실험구의 붕어와는 다르게 빛을 쬐일 수가 없기 때문이었다. 또한 식품첨가물의 경우 이 이하의 농도에서는 아래의 결과와 같이 뚜렷하게 melanin 저해 현상을 관찰할 수 없기에 상대적으로 농도를 증가시켜 사용하였다.

Tyrosinase 저해제가 생체내에서 melanogenesis에 미치는 영향을 알아보기 위하여 검은툭눈붕어를 NaCl 용액에서 일주일간 양식하고 약 4시간 동안 수도물에서 어체 외부의 소금기를 제거한 후 각 처리구의 어항에 담고 6일간 양식한 후 검은툭눈붕어의 측선 부위 비늘, 가슴 부위 및 등지느러미의 색도를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 처리하지 않은 대조구 검은툭눈붕어의 측선 부위 비늘의 명도 (L value, whiteness)

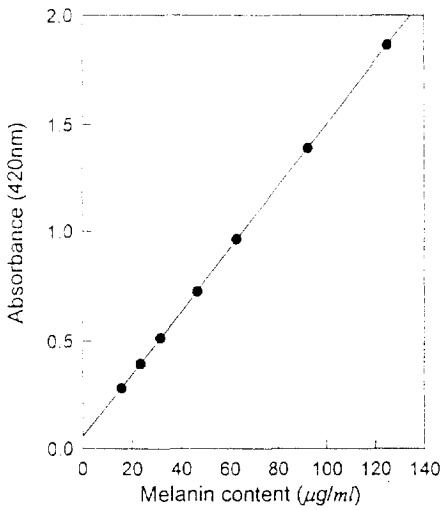

Fig. 1. Standard curve of melanin dissolved in 1.0 N NaOH solution

는 25.77이었으나, 저해제 처리구 붕어의 측선 부위 비늘의 명도는 26.13~32.81로 전반적으로 대조구보다 높아졌으며 황색도 (b value, yellowness) 역시 대조구의 6.43에서 처리구는 7.31~16.71로 높아졌다. 등지느러미와 가슴 부위의 색도 변화도 측선 부위의 경우와 유사하게 대조구와 비교하여 처리구 검은툭눈붕어가 명도와 황색도가 높은 경향을 보였다. 이 결과에서 저해제의 melanogenesis 억제 효과는 어체에 국소적으로 나타나는 것이 아니라 전체적으로 나타남을 알 수 있었다. 가슴 부위는 근본적으로 melanin 분포가 적기 때문에 명도와 황색도가 측선 부위의 비늘이나 지느러미보다 높게 나타났다.

한편, 일본의 Higa는[13] tyrosinase 저해제로 잘 알려져 있는 kojic acid의 melanogenesis 억제 작용에 관한 실험에서 처리 10~30일 후 어체색의 퇴색이 인정되었고 50일 후 melanophore의 수가 감소하고 소형화 되었다고 보고한 바 있는데, 이 결과와 비교할 때 본 실험에서 처리 6일만에 상기한 바와 같이 변색이 있었던 결과는 본 실험에 사용한 각종 tyrosinase 저해제가 식품 뿐만 아니라 kojic acid와 같이 화장품 원료로도 사용이 가능할 것으로 생각된다. 본 실험은 반복하여도 어체의 색 변화 경향이 같게 나타나 재현성이 있었으며 따라서 검은툭눈붕어를 이용한 tyrosinase 저해제의 melanogenesis 억제 효능평가는 생체에서의 미백효과 평가방법으로 유용한 수단으로 판단되었다. 그러나, 어체마다 색도차가 크기 때문에 색도계로 측정한 L과 b 값은 실험 때마다 일치하지는 않았다.

Table 2. Effect of tyrosinase inhibitors on the melanin content of scale and tail fin of gold fish (jet black color)

Melanin content (μg/mg)	Control group	Food additive group	Microbial inhibitor group	Plant extract group
Scale	5.09	3.03	3.36	4.45
Dorsal+caudal fin	21.41	13.20	15.63	22.50

Melanin 표준곡선 (Fig. 1)을 이용하여 검은툭눈붕어의 측선비늘과 꼬리지느러미의 melanin함량을 측정한 결과는 Table 2에 요약하였다. 측선비늘의 경우 대조구에서는 건조된 측선비늘 1 mg당 melanin 함량이 5.09 μg 수준인 반면에 식품첨가물 처리구는 3.03 μg, microbial inhibitor 처리구에서는 3.36 μg, 식물체 추출액 처리구에서는 4.45 μg을 보여 측선비늘 단위무게당 melanin 함량이 대조구에 비해 각각 40%, 33%, 12%가 감소되었음을 알 수 있었다. 반면에 꼬리지느러미의 경우는 대조구의 건조시료 1 mg 당 melanin 함량이 21.41 μg 수준인 반면에 식품첨가물 처리구는 13.20 μg, microbial inhibitor 처리구에서는 15.63 μg, 식물체 추출액 처리구에서는 22.50 μg을 보여 대조구에 비해 대체적으로 melanin 함량이 감소하는 경향을 보이나 식물체 추출액 처리구에서는 미미하지만 오히려 함량이 높게 나타났다.

한편, 동일한 처리구내에서 측선비늘과 꼬리지느러미의 단위무게당 melanin 함량비를 계산하면 전반적으로 지느러미 부위가 비늘 부위에 비해 4~5배 높게 나타나는 데 이는 비늘의 1/3 정도에는 melanin이 존재하지 않는데다가 melanin이 존재하는 부위도 비늘의 두께를 기준으로 보면 바깥 부분만 색소가 있고 살 (fish flesh) 쪽에는 melanin이 존재하지 않기 때문이다.

저해제를 처리한 6일 후에 각 붕어의 아가미 끝 부분에서 3번째 측선상에 위치한 비늘과 등지느러미를 절취하여 현미경으로 melanin을 관찰하였다 (Fig. 2와 3). Control은 보통 검은툭눈붕어를 나타내는데, melanin 농도가 높은 것을 관찰할 수 있었으며 단위면적당 melanophore의 수가 많으며 melanophore 크기도 큰편이었다. 그러나, tyrosinase 저해제 처리구에서는 비늘과 지느러미 모두 melanin 분포가 낮아진 것을 관찰할 수 있었고 일반적으로 단위면적당 melanophore의 수가 감소하였으며 하나의 melanophore의 크기 역시 작아졌음을 알 수 있다. 식품첨가물 처리구의 경우 melanin 색소 농도가 가장 낮아 처리한 저해제는 melanogenesis 억제효과가 생체에서 발휘된다는 점이 명확해 보인다. Microbial inhibitor 처리구에서도 식품첨가물 처리구 보다는 미약하지만 비늘과 지느러미

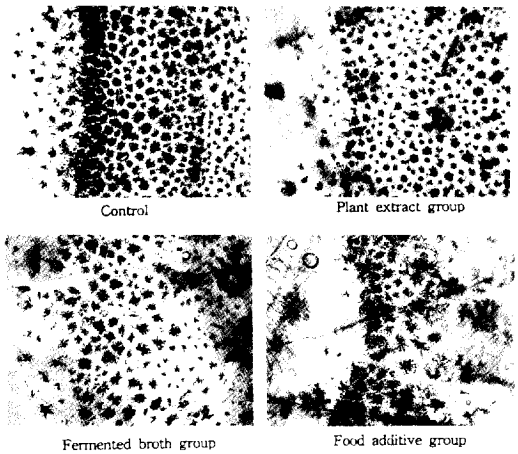

Fig. 2. Micrographs of melanin pigment in the scale of gold fish (jet black color) When gold fish (jet black color) was treated with tyrosinase inhibitors, number of melanophore per unit area and size of one melanophore in the scale were generally reduced

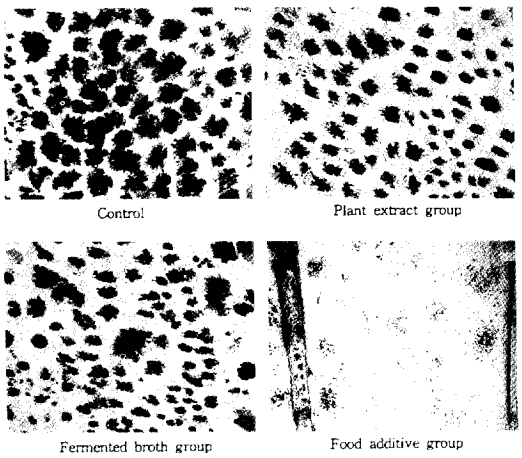

Fig. 3. Micrographs of melanin pigment in the dorsal fin of gold fish (jet black color) When gold fish (jet black color) was treated with tyrosinase inhibitors, number of melanophore per unit area and size of one melanophore in the dorsal fin were generally reduced

모두에서 melanin의 분포가 낮아졌다고 판단되며 식물체 추출액 처리구도 효과가 상대적으로 미약해 보이지만 melanogenesis 억제효과가 인정되었다.

Fig. 2에서 모든 사진의 왼쪽에 색소가 없는 부분은 바로 앞 비늘에 파묻힌 부위로 붕어에 붙어 있을 때에는 외관상 보이지 않으며 여기에는 melanin 색소가 거의 존재하지 않는다.

Fig. 4는 tyrosinase 저해제를 처리한 검은툭눈붕어

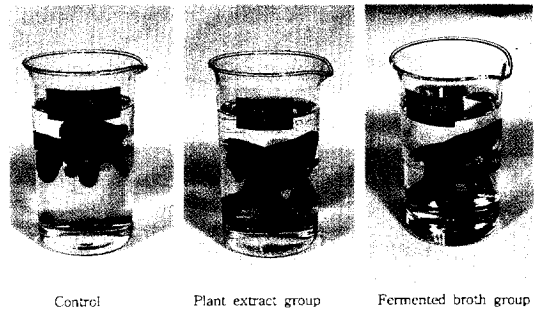

Fig. 4. Photographs of gold fish (jet black color) treated with tyrosinase inhibitors Supplement of tyrosinase inhibitors to gold fish (jet black color) could inhibit melanogenesis of the fish, resulting in discoloration

를 보여주는 사진으로 control은 보통의 검은툭눈붕어를 보여주며 식물체 추출액 처리구는 황색도가 약간 증가되었고 microbial inhibitor (=fermented broth) 처리구에서는 어체의 색도가 뚜렷이 퇴색되었음을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 이들 저해제는 인체에서도 효과가 나타날 가능성이 매우 높다고 생각되며 식품을 통해서도 기미나 노인성 검버섯을 치유할 수 있는 가능성이 있다고 생각되었다.

요 약

검은툭눈붕어를 이용하여 tyrosinase 저해제가 어체의 melanogenesis에 미치는 영향을 평가하였다. 저해제로는 glutathione, cysteine, benzoic acid를 각각 5, 5, 1 mM씩을 혼합하여 첨가한 식품첨가물 처리구, 표고버섯을 주기질로 하여 *Aspergillus oryzae*를 발효시켜 얻은 microbial inhibitor 처리구, 설록차, 무, 팽이버섯, red chicory 등 4종의 식물체 추출액 혼합물 처리구로 나누어 효능을 평가하였다. 검은툭눈붕어를 0.9% NaCl 용액에서 일주일간 양식하면서 stress를 가하여 비늘의 melanin 농도를 높이고 다시 민물에 담고 각 처리구의 저해제를 첨가한 용액에서 6일간 양식한 후 가슴 부위, 측선 부위 및 등지느러미의 색을 색도계로 측정하고 현미경으로 melanin을 관찰하였을 때 식품첨가물 처리구와 microbial inhibitor 처리구의 색은 대조구보다 명도와 yellowness가 높아진 것으로 나타나 melanogenesis 억제 효과가 뚜렷하였다. 한편, 농산물 처리구의 경우에도 미약하지만 효과가 인정되었다. 저해제를 처리한 검은툭눈붕어와 대조구 붕어의 측선 부위 비늘과 등지느러미를 절취하여 현미경으로 관찰한 결과 저해제 처리구에서는 단위 면적당 melano-

phore의 수가 감소하고 하나의 melanophore의 크기도 작아진 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업의 지원으로 이루어진 결과임을 밝힙니다.

문 헌

1. Nicolaus, R.A.: In *Melanins*. Herman, Paris (1968)
2. Raper, H.S.: The aerobic oxidase. *Physiol. Rev.*, **8**, 245 (1928)
3. Mason, H.S.: Structure of melanins. In *Pigment Cell Biology*, Gorden, M. (Ed.), Academic Press, New York, p.563 (1959)
4. Iyengar, R. and McEvily A.J.: Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci. Technol.*, **3**, 60 (1992)
5. Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M. and Kamei H.: A new screening method for melanin biosysthesis inhibitiors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiot.*, **43**, 1601 (1990)
6. Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomota, K., Hatori, M., Yamamoto, H., Kamei, H., Miyaki, T., Konish, M. and Oki, T.: *J. Antibiot.*, **44**, 25 (1991)
7. Takamatsu, S., Rho, M.C., Hayashi, M., Komiyama, K., Tanaka, H. and Omura, S.: *J. Antibiot.*, **46**, 1526 (1993)
8. Akiu, S., Suzuki, Y., Asahara, T., Fujinuma, Y. and Fukuda, M.: Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis. 日皮會誌, **101**, 609 (1991)
9. Nakayama, H., Watanabe, N., Nishioka, K., Hayakawa, R. and Hika, Y.: Treatment of chloasma with kojic acid cream. 臨皮, **36**, 715 (1982)
10. 이충환, 전효곤, 서영배, 고영희 : *Streptomyces* sp. 20747이 생산하는 Tyrosinase-Inhibiting Isoflavonoids. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 139 (1993)
11. 정승원, 이남경, 김석중, 한대석 : Tyrosinase 활성을 저해하는 식물체의 탐색. 한국식품과학회지, **27**, 891 (1995)
12. 정승원, 한대석, 김석중, 전문진 : 버섯배지를 이용한 tyrosinase 저해제 발효. 산업미생물학회지, **24**, 227 (1996)
13. Higa, Y.: Inhibitory action of kojic acid on melanogenesis. *Fragrance J.*, **63**, 40 (1983)
14. Takiwaki, H.: How to measure pigmentation quantitatively: A review of current studies. *Fragrance. J.*, **Supplement 14**, 64 (1995)
15. Vamos-Viryazo, L.: Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**, 49 (1981)

(1996년 7월 18일 접수)