

방선균 F-97이 생산하는 Tyrosinase 저해제의 정제 및 특징

방병호 · 이문수¹ · 김진오² · 이동희^{2,*}

을지대학교 식품과학부, ¹한국생명공학연구원, ²건국대학교 미생물공학과

Purification and Characteristics of Tyrosinase Inhibitor Produced by Actinomycetes F-97

Byung-Ho Bang, Moon-Soo Rhee¹, Jin-O Kim² and Dong-Heui Yi^{2,*}

Division of Food Science, Eulji University, 212, Yangji-dong, Sujeong-gu, Sunnam-si, Gyeonggi-do 461-713, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea

²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-Gu, Seoul 143-701, Korea

Received April 22, 2008; Accepted August 5, 2008

An actinomycetes F-97 producing tyrosinase inhibitor was isolated from soil samples. Isolation and purification of tyrosinase inhibitor produced by F-97 was performed as follows: IRC-120 (NH₄⁺ type) column chromatography, silica gel column chromatography, C18 column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography were used successively after the centrifuged supernatant was adjusted to pH 4.0. To identify the purity of the inhibitor, octadecylsilyl(ODS) HPLC was carried out with 5% methanol as a mobile phase. Finally, the purification yield of a tyrosinase inhibitor was 5.24%. The inhibitor was very soluble in water, methanol and ethanol but insoluble in acetone, butanol, ethylacetate and chloroform. The λ_{\max} value of this inhibitor in water was 194 nm under UV light. The biochemical test of the inhibitor was positive in Molish, Benedict, conc. H₂SO₄, and KMnO₄ tests but negative in iodine, ninhydrin, Million, Sakaguchi, xanthoproteic and Emerson tests. The tyrosinase inhibitor was stable against heat treatment of 100°C for 50 minutes and pH 4-9. The IC₅₀ value of this inhibitor was 19.2 µg/ml for mushroom tyrosinase. In 1,000 µg/ml inhibitor concentration, inhibition zone was 27 mm for *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049. The inhibition of F-97 against mushroom tyrosinase was competitive with tyrosine.

Key words: Actinomycetes, inhibitor, melanin, tyrosinase

서 론

멜라닌(melanin)은 tyrosinase의 작용으로 생합성되는 것으로 보고되고 있다. 이 효소는 구리와 결합한 효소로서, 동·식물, 미생물 및 사람 등에 널리 존재하는 페놀류의 고분자 물질의 색소이다. 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하고 있다.¹⁻⁵⁾ 또한 야채 또는 과일류에서도 tyrosinase 등과 같은 polyphenol oxidase가 식품의 갈변화 현상을 초래한다.⁶⁾

멜라닌의 생합성은 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)라는 세포에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생산되며 멜라닌은 알카리 용해도 및 발색 특성에 따라 eumelanin과 pheomelanin으로 구분하거나 물

리적, 화학적으로 특성이 유사한 trichochrome을 포함하여 크게 3종류로 분류하고 있으나 생합성 경로는 모두 tyrosine으로부터 tyrosinase에 의해 촉매되는 dopaquinone을 거쳐 합성이 이루어지며 이후 아미노산 혹은 단백질 중합반응에 의해 최종적으로 멜라닌이 합성된다.⁷⁾

멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정되는데, 멜라닌의 양이 많을수록 검은 피부색을 띤다. 인종마다 피부색이 다른 것은 멜라닌 세포의 수가 다르기 때문이 아니라, 멜라닌 세포의 크기와 만들어지는 멜라닌의 양이 다르기 때문이다. 멜라닌 생합성 과정에서 한가지 효소만이 유일하게 관여하므로 멜라닌 합성을 억제하는 방법으로 화장품 업계에서는 tyrosinase 저해제를 탐색하고 응용해 왔다. 현재 tyrosinase 저해제가 미백에 관련된 화장품이나 의약품 생산의 증가 및 식품의 갈변방지에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.⁸⁾ 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 ascorbic acid, arbutin, benzoic acid, azelaic acid 등으로 그 중에서도 특히, arbutin은 미백상용제로 널리 쓰이고 있다.¹⁶⁾ 그러나 피부 안정성, 제형안정성, 경제성 등을 고려하여

*Corresponding author

Phone: +82-2-450-3522; Fax: +82-2-3437-8360

E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

제한된 양만 사용되고 있다. 최근에는 여러 가지 안정성과 생활수준 향상과 더불어 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물을 이용한 미백제의 개발과 관련된 연구가 진행되고 있다. 즉, 고구마,¹⁾ 도깨비부채 뿌리,⁵⁾ 감초,⁹⁾ 치자,¹⁰⁾ 쑥,¹¹⁾ 솔잎,¹²⁾ 울피¹³⁾ 등 천연물질로부터 tyrosinase 효소활성 저해제 개발에 대한 연구가 활성화되고 있다.

본 연구에서는 독성이 적고, 활성이 높으면서 안전한 새로운 저해제를 미생물을 대상으로 얻고자 tyrosinase 저해제를 강하게 분비하는 방선균 F-97을 분리하고, 이 균에 의한 tyrosinase 저해제의 생산 최적 조건을 검토한 결과는 이미 전보에서 보고하였다.¹⁴⁾ 여기서는 F-97이 생산하는 tyrosinase 저해제를 정제하고, 이 물질의 이화학적 성질을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 저해제 생산. 전보¹⁴⁾에서 사용한 tyrosinase 저해 활성이 있는 방선균 F-97을 사용하였다. Tyrosinase 저해제 생산을 위한 균의 배양은 저해제 생산배지(soluble starch 3.0%, peptone 0.36%, K₂HPO₄ 0.1 mM, pH 7.0) 20 ml/을 100 ml 삼각 플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 가압멸균 후 포자 현탁액 2 µl/ml를 접종하여 180 rpm에서 72시간 진탕배양하고 이것을 거름종이로 거른 후 여과액을 정제에 이용하였다.

선별 균주의 포자 현탁액 제조 및 보존. 순수분리된 선별균주를 선별용 사면배지¹⁴⁾에서 30°C, 7일간 배양한 후 1% glycerol이 첨가된 살균수 3 ml를 넣고 백금으로 포자를 현탁한 후 약 10분간 초음파에서 처리하였다. 제조된 포자 현탁액은 -60°C deep freezer(Sam Won Co.)에서 보관하였고, 이 후 실험의 접종원으로 사용하였다.

Mushroom tyrosinase에 대한 저해활성의 측정. Tyrosinase에 대한 저해활성은 검체 15 µl를 microplate(96 well)에 넣고, 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 150 µl와 3 mM L-tyrosine 용액 25 µl를 넣은 후, 2,100 unit/ml mushroom tyrosinase (Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 µl를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, Emax)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다. Tyrosinase에 대한 저해율(%)은 다음 식에 의하여 계산하였다.¹⁵⁾ 그리고 IC₅₀ 값은 효소활성 저해율을 50%에 달하는 저해제의 농도로 결정하였다.¹⁶⁾ 저해제의 양은 10분동안 20%의 저해율을 나타내는 농도를 1 unit로 하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{(D - C)} \times 100$$

- A: 저해제를 넣은 것의 반응 전의 흡광도
- B: 저해제를 넣은 것의 반응 후의 흡광도
- C: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전의 흡광도
- D: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후의 흡광도

Tyrosinase 저해제의 정제. 전보¹⁴⁾의 tyrosinase 저해제 생산 배지에서 얻은 배양액을 Fig. 1과 같이 정제하였다. 각 단계별 저해제의 활성은 mushroom tyrosinase 분석법으로 확인하였으며 정제된 저해제의 순도는 HPLC(high performance liquid

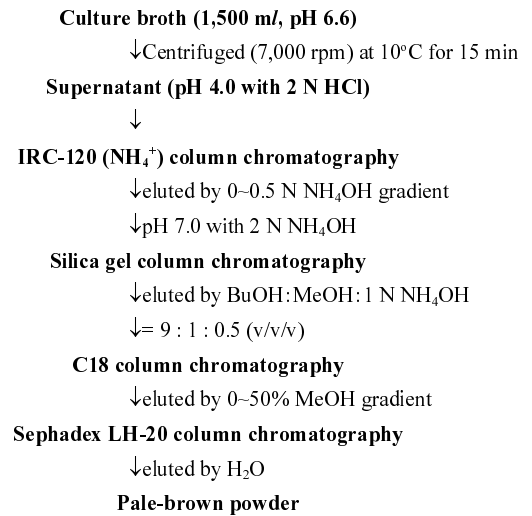


Fig. 1. Purification procedure of a tyrosinase inhibitor from *Actinomyces* F-97.

chromatography)로 확인하였다.

저해제의 이화학적 성질. Tyrosinase 저해제의 UV absorption spectrum은 190~400 nm 파장에서 2 mm/sec 속도로 scanning을 하였다. 정제된 tyrosinase 저해제(HPLC peak 2)의 각 용매에 대한 용해도는 각 용매 1 ml에 1 mg을 녹이고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 감압 농축한 후 다시 물에 녹여 mushroom tyrosinase에 대한 저해 정도를 측정하였다. 저해제의 pH 안정성은 pH 3~12까지 1단위로 조절하여 37°C에서 1시간 처리하였고, 열 안정성은 100°C에서 1시간 처리한 후 각각 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해제의 정제

IRC-120 column chromatography. Tyrosinase 저해제 생산 배지에서 얻은 배양액 1,500 ml를 7,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 회수하여 pH 4로 조절하고 IRC-120 (NH₄⁺) column(3×40 cm)에 여액을 7.5 ml/min의 속도로 통과시킨 다음 0~0.5 N NH₄OH를 사용하여 7.5 ml/min의 속도로 용출하면서 100 ml씩 분획하고 그 분획의 tyrosinase의 상대 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에서와 같이 7번에서 16번의 분획에서 tyrosinase 저해제가 용출되었다.

Silica gel column chromatography. IRC-120 column chromatography에서 얻은 활성 부분을 감압농축하여 5 ml의 methanol에 녹여 silica gel column(2.5×25 cm)에 주입한 후 butanol:methanol:1 N NH₄OH(9:1:0.5, v/v/v) 혼합 용매를 사용하여 2 ml/min 속도로 용출시키면서 8 ml씩 분획하고 그 분획의 tyrosinase의 상대 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 3에서와 같이 15에서 25번까지의 분획에서 tyrosinase 저해제가 용출되었다.

C18 column chromatography. Silica gel column chromatography에서 얻은 활성 부분을 감압 농축하여 5 ml의 물에 녹여 C18 column(2.5×15 cm)에 주입한 후 0~50%의

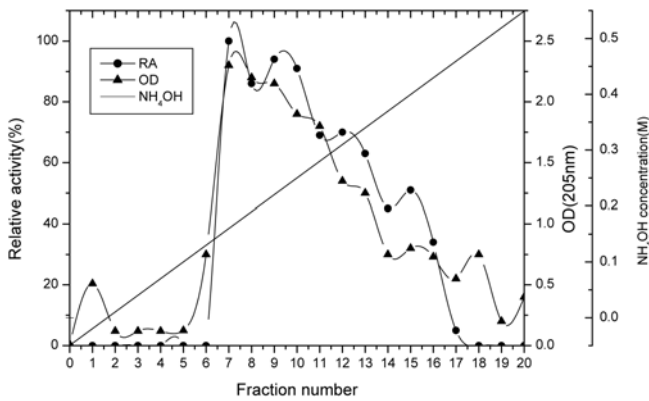


Fig. 2. The chromatogram on IRC 120 column chromatography of a tyrosinase inhibitor.

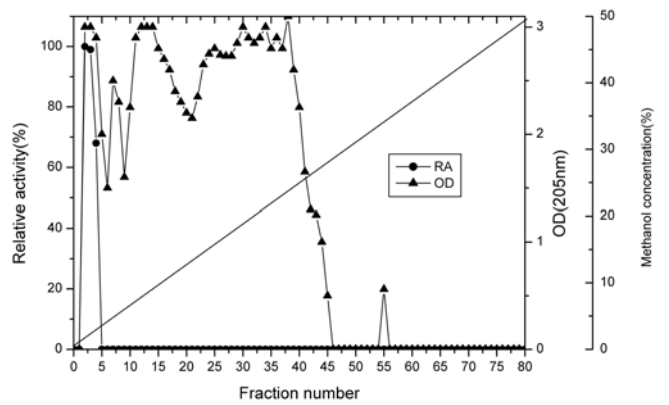


Fig. 4. The chromatogram on C18 column chromatography of a tyrosinase inhibitor.

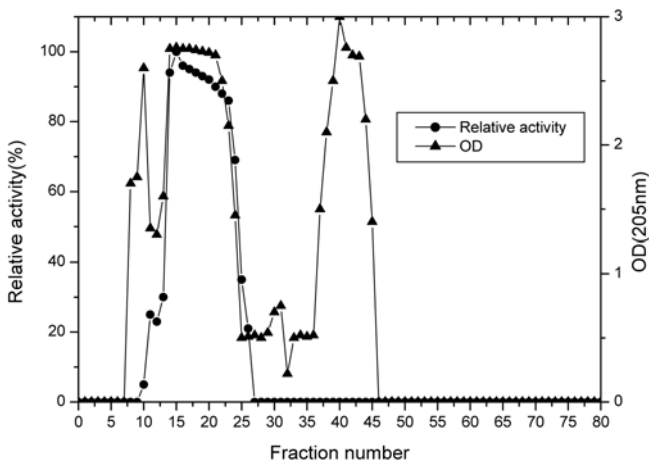


Fig. 3. The chromatogram on silica gel column chromatography of a tyrosinase inhibitor.

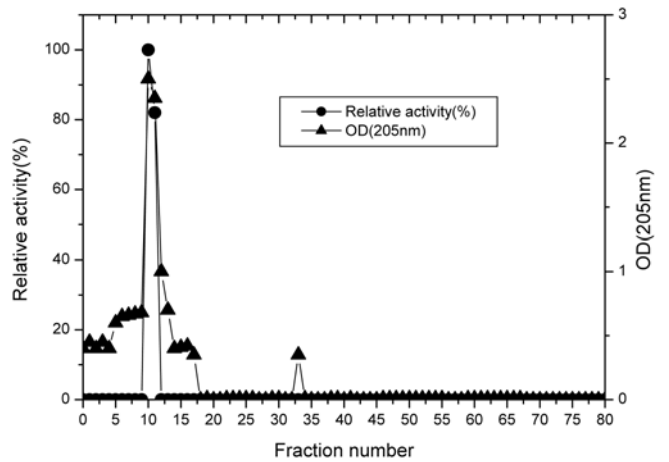


Fig. 5. The chromatogram on Sephadex LH-20 column chromatography of a tyrosinase inhibitor.

methanol을 사용하여 2 ml/min 속도로 용출시키면서 3 m²씩 분획하고 그 분획의 tyrosinase의 상대 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 4에서와 같이 3번에서 5번까지의 분획에서 tyrosinase 저해제가 용출되었다.

Sephadex LH-20 column chromatography. C18 column chromatography에서 얻은 활성 부분을 감압 농축하여 1 ml의 물에 녹여 증류수로 충전된 sephadex LH-20 column(1.0×15 cm)에 주입 후 증류수로 사용하여 1 ml/min 속도로 용출시키면서 3 m²씩 분획한 결과는 Fig. 5와 같이 10번부터 11번까지 분획에서 tyrosinase 저해제가 용출되었다.

HPLC. Sephadex LH-20 column chromatography에서 얻은 활성 부위를 동결건조한 후 증류수에 녹여 ODS(octadecylsilyl) column(YMC-pack ODS AQ, particle size 5 μm pore size 120Å, 2×25 cm)을 사용하여 5% MeOH 용매로 205 nm 파장에서 1.5 ml/min 속도로 용출하면서 HPLC를 한 결과 Fig. 6과 같이 retention time 1.8분과 2.3분에서 tyrosinase 저해제가 용출되었다. 최종 정제 수율은 5.2%였다(Table 1). HPLC를 통해 체류 시간 2.3분(peak 2)에서 활성 분획을 분리하고, 용매를 감압건조기로 제거한 후 분말의 tyrosinase 저해제를 이화학적 실험에 이용하였다.

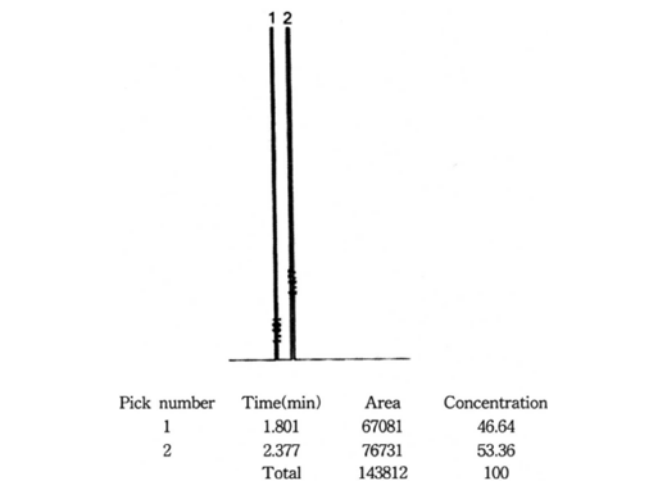


Fig. 6. The chromatogram on ODS HPLC of a tyrosinase inhibitor.

Tyrosinase 저해제의 이화학적 성질

pH 안정성. 본 균주가 생산하는 tyrosinase 저해제의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0에서 12.0까지 pH 1 단위로 조절한 1 ml Davies 광역 완충용액(50 mM)에 tyrosinase 저해제를

Table 1. Summary of purification steps of tyrosinase inhibitor from culture broth

Step	Weight (mg)	Total units	Specific units	Yield (%)
Culture broth	1,500 ml	94,500		1,000
RC-120 column chromatography	810	47,000	58.0	49.7
Silica gel column chromatography	140	22,000	157.1	23.2
C18 column chromatography	37	9,600	259.4	10.16
Sephadex LH-20 column chromatography	10	4,950	495.0	5.24

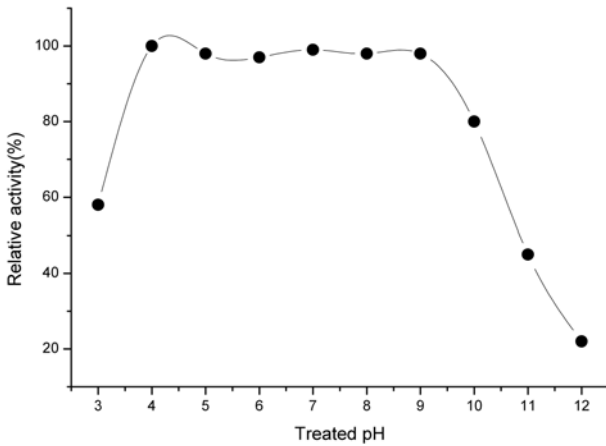


Fig. 7. Effect of pH on the tyrosinase inhibitor stability.

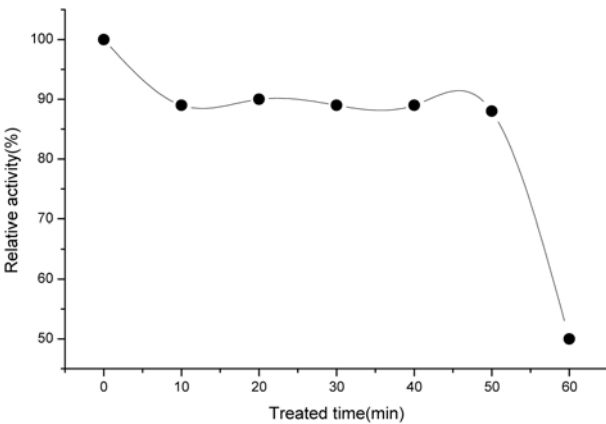


Fig. 8. Effect of heat on the tyrosinase inhibitor stability.

100 µg/m²에 가하고 37°C 항온 수조에서 1시간 처리한 후 잔존 활성을 측정하는 결과는 Fig. 7와 같이 pH 4.0에서 9.0의 범위에서 안정하였고, pH 10에서는 약 20%, pH 3에서는 40% 정도의 활성 감소를 보였다. 이 등¹⁾의 고구마에 존재하는 tyrosinase 저해제가 pH 5~7에서 안정하다는 보고보다 본 저해제가 더 넓은 pH에서 안정하였다.

열 안정성. 본 균주가 생산하는 tyrosinase 저해제의 열 안정성을 조사하기 위하여 10 ml phosphate 완충용액(pH 7.0, 50 mM)에 tyrosinase 저해제를 100 µg/m²에 넣고 100°C 항온 수조에서 1시간 처리한 후 잔존 활성을 측정하는 결과는 Fig. 8과 같이 100°C에서 10분 처리시 10% 정도의 활성이 저하되었지만, 처리 시간 50분까지 비교적 안정하였고, 60분에서는 약 50%의 활성 감소를 보였다. 이는 melanostatin이 155°C까지 안

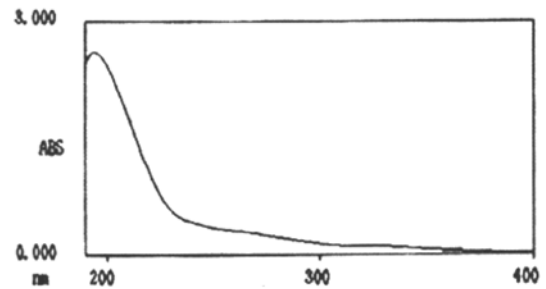


Fig. 9. UV absorption spectrum of a tyrosinase inhibitor.

Table 2. Melanin synthesis inhibition activity of some compounds and F-97

Compound	<i>S. bikiniensis</i> NRRL B-1049		Mushroom tyrosinase
	Concentration (µg/ml)	Inhibition zone (mm)	IC ₅₀ (µg/ml)*
4-hydroxyanisole	1000	40	15.0
Kojic acid	1000	0	15.0
Arbutin	1000	0	15.0
F-97	1000	27	19.2

*IC₅₀ represent the concentration causing 50% inhibition of tyrosinase activity.

정한 것에 비해서는 낮으나, melanoxazol¹⁷⁾이 70°C까지 안정한 것에 비해서는 열 안정성이 높았다.

용해도 검사. 정제된 tyrosinase 저해제의 각종 용매에 대한 용해성을 조사한 결과(data not shown) 물과 alcohol에는 잘 녹았으나 acetone, butanol, ethylacetate, chloroform, n-hexane 등에는 전혀 녹지 않는 것으로 보아 수용성 물질로 추정하였다.

자외선 흡수대. 정제된 tyrosinase 저해제의 UV absorption spectrum은 Fig. 9에 나타난 바와 같이 194 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다.

생화학 반응. Tyrosinase 저해제의 생화학 반응을 검사한 결과(data not shown) Iodine, Ninhydrin, Million, Sakaguchi, Xanthoproteic, Emerson 시험에서는 음성하였고, Molish, Benedict, conc. H₂SO₄, KMnO₄ 시험에서는 양성반응을 나타내었다. 위의 결과를 보아 본 물질은 당을 함유하고 있고, 이중 결합을 가지고 있으나 질소는 포함하지 않는 것으로 추정하였다.

Tyrosinase 저해제의 생물학적 성질

저해활성. 멜라닌 생성 저해제로 알려진 각종 물질과의 활성도를 비교한 결과 Table 2와 같다. 이 결과 본 물질의 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀ 값은 19.2 µg/ml로 arbutin 등의 물질에 비해서 활성이 낮았다. 이 등¹⁶⁾이 보고한

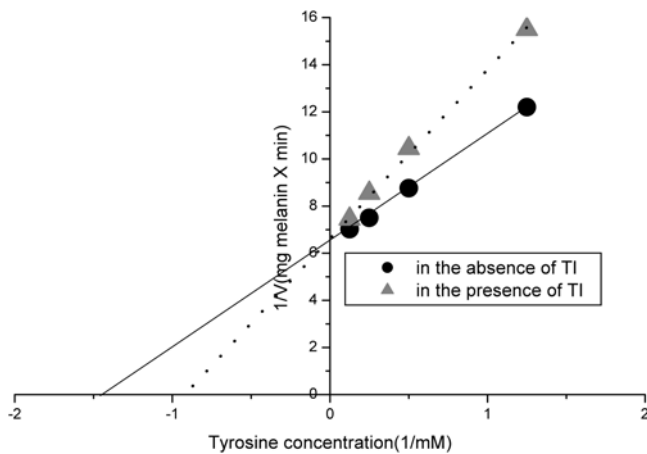


Fig. 10. Lineweaver-Burk plots for mushroom tyrosinase in the presence and absence of an inhibitor.

Streptomyces sp. 20747이 생산하는 당을 함유하는 isoflavonoid 계열의 물질보다는 IC_{50} 값이 낮았으나, *S. bikiniensis*의 멜라닌 생합성에 대한 저해 활성이 없다는 보고와는 상이하였다.

저해 양상. Tyrosinase에 대한 본 저해제의 저해 양상을 알아보기 위해서 기질 농도에 따른 속도변화와 tyrosinase 저해제의 첨가에 따른 속도 변화를 알아본 결과 Fig. 10과 같았으며 억제 양상은 V_{max} 가 동일하고 K_m 값이 상승되는 경쟁적 저해로 나타났다. 이는 이 등¹⁸⁾이 보고한 isoflavonoid 계열 물질과는 동일한 결과이지만, *Trichoderma harzianum*이 생산하는 MR304A와 B가 비경쟁적 저해를 보인 것과는 상이하였다.

초 록

토양으로부터 tyrosinase 저해제를 생산하는 방선균 F-97을 분리하여, 이 균이 생산하는 tyrosinase 저해제를 정제하였다. 먼저 배양액을 원심분리하고 이 여액을 pH 4.0으로 조절한 후 IRC-120(NH_4^+ type) column chromatography, Silica gel column chromatography, C18 column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하여 정제하였다. 정제도 확인은 ODS HPLC를 이용하여 확인하였으며, 최종 정제 수율은 5.24%이었다. 물리 화학적 특성으로 tyrosinase 저해제는 water, methanol, ethanol 등에는 잘 녹았으나, acetone, butanol, ethylacetate, chloroform 등에는 녹지 않는 수용성 물질이었다. 물을 용매로 UV 흡광도를 측정할 결과 194 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 본 tyrosinase 저해제는 Iodine, Ninhydrin, Millon, Sakaguchi, Xanthoproteic, Emerson 시험에서는 음성이었고, Molish, Benedict, conc. H_2SO_4 , $KMnO_4$ 시험에서는 양성이었다. 저해제의 열 안정성은 100°C 50분까지 안정하였고, pH 4-9에서 안정하였다. Tyrosinase 저해제의 mushroom tyrosinase에 대한 IC_{50} 값은 19.2 $\mu g/ml$ 이었고, *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049에 대한 저해활성은 1,000 $\mu g/ml$ 일 때 27 mm이었다. 그리고 본 저해제의 저해 양상은 경쟁적 저해로 확인되었다.

Key words: Actinomycetes, inhibitor, melanin, tyrosinase

참고문헌

- Lee, H. J., Lee, M. K. and Park, I. S. (2006) Characterization of mushroom tyrosinase inhibitor in sweet potato. *J. Life Sci.* **16**, 396-399.
- Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. S. (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Tech.* **27**, 891-896.
- Yoneta, A., Yamashita, T., Jin, H. Y., Kondo, S. and Jimbow, K. (2004) Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res.* **14**, 387-394.
- Park, S. S., Ryu, Y. B., Lee, Y. H., Cho, Y. U., Cho, S. J., Choi, Y. J., Park, K. H. and Gal, S. W. (2007) Inhibition of melanin synthesis by mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the Mulberry leaf extract. *J. Life Sci.* **17**, 816-821.
- Choi, S. Y., Kang, N. J. and Kim, H. C. (2006) Inhibitory effects of root extracts on melanin biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **14**, 27-30.
- Cho, Y. K., Shin, D. S., Paik, D. H., Yoon, D. Y. and Shin, D. M. (2006) tyrosinase inhibitory effect of 3,4-dihydroxybenzaldehyde isolated from *Pinellia ternata*. *Kor. J. Herbology* **21**, 1-7.
- Han, D. S., Jung, S. W., Kim, S. J., Kim, S. H. and Ahn, B. H. (1996) Effect of tyrosinase inhibitors on the melanogenesis. *Korean J. food Sci. Technol.* **28**, 1089-1094.
- Kang, H. S., Kim, H. R., Byum, D. S., Park, H. J., Choi, J. S. (2004) Rosmarinic acid as a tyrosinase inhibitors from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural Product Sciences*, **10**, 80-84.
- Lee, J. S., Kim, J. A., Cho, S. H., Son, A. R., Jang, T. S., So, M. S., Chung, S. R. and Lee, S. H. (2003) Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Glycyrrhiza glabra*. *L. Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 33-39.
- Kwak, J. H., Kim, Y. H., Chang, H. R., Park, C. W. and Han, Y. H. (2004) Inhibitory effect of Gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 437-440.
- Kwak, J. H., Seo, U. K. and Han, Y. H. (2001) Inhibitory effect of Mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 220-223.
- Sung, K. C. and Kim, K. J. (2005) tyrosinase activated inhibition effect & analysis of Pine-Needles extract. *J. Kor. Oil. Chem. Soc.* **22**, 71-76.
- Yang, M. J., Lim, J. S., Ahn, H. S., Kim, M. A. and Ahn, R. M. (1999) Inhibitory effect of Chestnut Bark extracts on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Kor. J. Env. Health Soc.* **25**, 37-43.
- Bang, B. H., Rhee, M. S., Kim, J. O and Yi, D. H. (2007) Optimal Culture Conditions on the Tyrosinase Inhibitor Production by Actinomycetes F-97. *J. Life Sci.* **17**, 798-804.
- Lee, C. H., Chung, M. C., Lee, H. J., Lee, K. H. and Kho, Y. H. (1995) MR304-1, A melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 641-646.

16. Lee, C. H., Chung, M. C., Lee, H. J., Lee, K. H. and Kho, Y. H. (1993) Tyrosinase-inhibiting isoflavonoids produced by *Streptomyces* sp. 20747. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 139-143.
17. Takahashi, S. R., Hashimoto, K., Hamano, T., Suzuki, Y. and Nakagawa, A. (1996) Melanoxazol, new melanin biosynthesis inhibitor discovered by using the larval haemolymph of silkworm, *Bombyx mori*, *J. antibiotics* **49**, 513-518.
18. Lee, C. H., Koshino, H., Chang, M. C., Lee, H. J. and Koh, Y. H. (1995) MR304-1, A new melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. *J. antibiotics* **48**, 1168-1170.