

*Trichoderma harzianum*이 생산하는 melanin 생성 저해물질 MR304-1

이충환 · 정명철 · 이호재 · 이계호¹ · 고영희*

한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과

MR304-1, A Melanin Synthesis Inhibitor Produced by *Trichoderma harzianum*

Choong-Hwan Lee, Myung-Chul Chung, Ho-Jae Lee,
Ke-Ho Lee¹ and Yung-Hee Kho*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115,
Yusong Taejon 305-600, Korea

¹Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract— During the screening of inhibitors of melanin biosynthesis from microbial secondary metabolites, a fungal strain MR304 which was capable of producing high level of an inhibitor was selected. Based on taxonomic studies, this fungus could be classified as *Trichoderma harzianum*. The active compound (MR304-1) was purified from culture broth by Diaion HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC. The inhibitor was identified as 3-(1,5-dihydroxy-3-isocyanocyclopent-(E)-3-enyl)prop-2-enoate by spectroscopic methods of UV, ESIMS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, NOE, HMQC and HMBC. MR304-1 showed strong mushroom tyrosinase inhibitory activity with IC₅₀ value of 0.25 µg/ml. It inhibited melanin biosynthesis with 15 mm inhibition zone at 30 µg/paper disc in *Streptomyces bikiniensis*, a bacterium used as an indicator organism in this work. It also inhibited melanin biosynthesis in B16 melanoma cells with a minimum inhibitory concentration of 0.05 µg/ml.

Melanin의 생합성은 식물, 미생물 및 동물에서 주로 tyrosinase(monophenol, dihydroxy-L-phenylalanin : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1)에 의해 이루어지는 것으로 보고되고 있다(1-4). Tyrosinase 저해제로 잘 알려진 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등은 강력한 melanin 생합성 저해활성을 보이지만 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포분래의 기능을 손상시키는 등의 부작용을 나타내며, kojic acid, arbutin 등은 이미 상품화되어 화장품, 식품 등에 미백제로 사용되고 있지만 활성 및 안전성에 문제점이 있는 것으로 나타났다(5). 따라서 세포독성이 낮고 melanin 생합성 저해활성이 높은 저해물질의 개발이 요구되고 있다.

1991년과 1993년에 Ishihara 등(6)과 Komiyama 등(7)은 미생물 발효액으로부터 각각 melanostatin과 OH-3084 K1등의 신규 melanin 생성 저해제를 분리

하여 보고한 바 있다.

본 연구자들은 melanin 생합성 저해제에 대한 계속적인 탐색(8, 9) 중에, 야생 식물체의 병반으로부터 분리한 곰팡이 균주인 *Trichoderma harzianum* MR 304 균주의 배양액으로부터 isocyanide 계열의 melanin 생합성 저해물질 MR304-1을 분리하였다. 본 연구에서는 생산 균주의 특성, melanin 생합성 저해물질의 분리정제, 물질의 이화학적 특성, 구조결정 그리고 melanin 생합성 저해활성을 조사하였는 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

전국 각지의 식물체 및 토양에서 곰팡이를 약 1500여 균주를 분리하였고, 이 분리균주 중에서 tyrosinase 저해효과 및 *Streptomyces bikiniensis*에 대한 melanin 생합성 저해효과를 나타내는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 제주도 지역에서 분리한 MR-304 균주

Key words: *Trichoderma harzianum*, isocyanide, tyrosinase inhibitor, melanin

*Corresponding author

였으며, 강한 melanin 생합성 저해활성을 나타내었다. Melanin 생합성 억제능을 시험하기 위한 시험균으로는 *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049를 사용하였으며 생명공학 연구소 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다.

선발균주 동정

선발된 MR-304 균주의 동정을 위하여 형태학적 특성 및 배양학적 특성을 비교 조사하였다(10, 11).

Melanin 생성 저해물질의 발효조건

선발균주 MR304로부터 활성물질의 생산은 sucrose(20 g/liter), lactose(10 g/liter), Bacto-peptone(3 g/liter), NaCl(5 g/liter), corn steep liquor(3 g/liter), KNO₃(2.3 g/liter)로 구성된 배지를 pH 6.0으로 조정하여 사용하였다. 250 ml Erlenmeyer 삼각플라스크에 상기 배지를 50 ml씩 첨가하여 25°C, 200 rpm으로 3일간 배양한 것을 종균으로 사용하였다. 동일조성의 발효배지 3 liter를 함유한 5 liter 발효조(한국발효기 KF-5L)에 종균을 3%(v/v)로 접종한 후, 통기량 1 vvm, 교반속도 200 rpm, 25°C의 조건에서 7일간 배양하였다.

Melanin 생성 저해물질의 분리정제

위와 같은 발효조건에서 배양한 배양 상등액 6 liter를 Diaion HP-20(600×60 mm, Mitsubishi Kasei Co.) column에 통과, 흡착시키고, 동량의 증류수로 수세한 후 30% methanol/증류수(v/v)로 용출시켜 활성분획을 농축한 후 동량의 ethylacetate로 3회 추출하였다. 이를 농축하여 Sephadex LH-20(Pharmacia LKB) column에서 30% methanol/증류수(v/v)로 용출시킨 후 활성 분획을 농축하였다. 활성분획을 최종적으로 HPLC(YMC-Pack ODS-AM(YMC Co., 250 × 10 mm I.D. S-5 μm, 120 Å), 60% acetonitrile, uv 220 nm, 1 ml/min)를 통해 체류시간 13분에서 활성분획을 분리하고, 용매를 감압건조기로 제거한 후 냉동건조하여 갈색분말의 활성물질 0.4 mg을 분리하고, MR304-1이라 하였다.

Melanin 생성 저해물질 MR304-1의 구조분석 및 이화학적 특성조사

MR304-1의 구조분석을 위한 NMR 분석은 Varian UNITY 300, JEOL JNM-Alpha 600(HMBC, NOE), JEOL JNM-Alpha 400(HMQC)을 이용하였으며, 용매는 CD₃OD를 이용하여 측정하였다. 분자량 결정은

ESIMS(electrospray ionization mass spectroscopy, VG Quattro 400 mass spectrometer)로 측정하였으며, UV spectrum(Shimadzu UV-260)은 methanol을 용매로 측정하였다.

Streptomyces bikiniensis melanin의 생성 저해

Streptomyces bikiniensis NRRL B-1049를 Papavizas' VDYA agar slant 배지(V-8 juice 200 ml, glucose 2 g, yeast extract 2 g, CaCO₃ 1 g, agar 20 g, 증류수 800 ml, pH 7.2)에서 2주간 28°C로 배양시켜 포자를 생성시킨 후 멸균수로 포자 현탁액을 만들었다. 0.2%의 yeast extract를 첨가한 ISP No. 7 평판배지에 포자현탁액 0.2 ml씩을 도포한 후 배지표면에 sample을 적신 paper disc를 올리고 28°C에서 배양하였다. 48시간 배양 후 생성된 melanin 생성 저해환의 크기를 대표적 melanin 생성 저해물질인 4-hydroxyanisole을 대조구로 하여 측정하여 melanin 생성 저해여부를 관찰하였다(9).

Mushroom tyrosinase 저해활성

Tyrosinase에 대한 저해활성은 검체 15 μl를 microplate(96 well)에 넣고, 0.1M phosphate buffer(pH 6.5) 150 μl와 1.5 mM L-tyrosine 용액 25 μl를 넣은 후, 2100 unit/ml mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05M phosphate buffer, pH 6.5) 7 μl를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Bio-Rad 3550)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다. IC₅₀ 값은 효소활성 저해율 50%에 달하는 저해물질의 농도로 결정하였다(9).

B16 melanoma 세포의 melanin 생합성에 대한 저해

B16 melanoma 세포의 melanin 생합성 저해도 판별은 다음과 같이 행하였다. B16 melanoma 세포를 5 × 10³ cells/ml의 농도로 10% fetal calf serum을 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium에 현탁시켰다. 현탁세포(5 ml)를 tissue culture flask에 넣은 후 검정 시료를 농도별로 첨가한 후, 5% CO₂-95% 공기조건으로 37°C에서 배양하였다. 4일간 배양 후 배양액의 색으로 melanin 생성정도를 1차 판별하고, 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻은 후 trypsinization 하였다. 세포를 튜브에 모은 후 PBS로 씻고, 세포의 색깔과 양을 대조구와 비교하여 2차 판별하였다(7).

결과 및 고찰

선발 균주의 분류

선발된 MR-304 균주의 생육상태는 PDA(potato dextrose agar) 배지에서 3일 배양시 직경이 7.5 cm 정도로 신속하게 생육하였으며, 청록색의 균층이 생육하면서 짙은 녹색으로 변화하였다. 집락의 배면은 색을 나타내지 않았다. 또한 형태적 관찰에 의하면 균사는 격막이 있고 무색투명하였으며, 직경이 3~5 μm 였다. 분생자병은 넓은 피라미드 모양을 이루고, 투명하며, 직선형이었다. 소병은 프라스크 모양 내지 반구형체였다. 한편 분생자는 투명하거나 옅은 녹색을 나타내었으며, 후막포자는 짧은 가지의 중간이나 끝에 풍부하게 존재하며, 직경이 5~10 μm 의 구형이나 반구형이었다(Table 1). 이상의 특성을 근거로 하여 MR 304 균주는 *Trichoderma harzianum*으로 분류되었다(10, 11). MR304 균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터에 보관 위탁하였으며, 그 수탁번호는 KCTC 0123BP이다.

저해물질의 구조분석 및 이화학적 특성

MR-304 균주가 생산하는 활성물질 MR304-1의 이화학적 특성은 다음과 같다. 본 물질은 갈색분말로 UV $\lambda(\text{MeOH})$ max 211 nm에서 흡수 peak를 보였으며, ESIMS 분석결과 m/z 232에서 (M+Na)⁺ peak가 관찰되어 분자량 209로 확인되었다. 또한 ESIMS 및 NMR에 의한 구조분석 결과 분자식은 $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ 로 결정되었다.

¹H-와 ¹³C-NMR spectral data는 Table 2에 나타낸 바와 같다. ¹³C-NMR data는 두 개의 tri-substituted double bond(C-3, C-4, C-7, C-8), 한 개의 oxygenated methine(C-9), 한 개의 oxygenated quaternary carbon(C-5), 한 개의 methoxy(C-1), 한 개의 carbonyl(C-2) 그리고 168.8 ppm에 한 개의 isonitrile carbon(C-10)이 존재함을 보여주었다. ¹H-NMR spectrum은 한 개의 singlet(methyl protons, H-1), 두 개의 doublets(methine protons(H-3, H-4)), 두 개의 doublets of doublets(methylene proton(H-6), methine proton(H-9)), 그리고 두 개의 doublets of doublets of doub-

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the strain MR304

Examined	Morphological and cultural characteristics
Colony	<ul style="list-style-type: none"> • grow rapidly • colony diameter on PDA: 7.5 cm after 3 days • conidiation: effuse (on PDA) compact, flat pustule, concentrated near the margin of the plate (on MA) • color: glaucous shade at first, rapidly turning dark green • reverse: colorless
Hyphae	<ul style="list-style-type: none"> • hyaline, smooth-walled, 3~5 μm in diameter
Chlamydospore	<ul style="list-style-type: none"> • abundant, intercalary and terminal on short branches, solitary • subglobose to ellipsoidal, 5~10 μm diameter • wall hyaline (1 μm thick)
Conidiophore	<ul style="list-style-type: none"> • entire structure broadly pyramidal • hyaline, smooth-walled, straight • wide near the base, tapering to the end • primary branches arising nearly at right angles or bent slightly toward the apex, complexly rebranched with secondary branches in whorls of 2~4 • ultimate branches 1-celled, cylindrical • conidiation develops first on the lowermost branches of the conidiophore
Phialide	<ul style="list-style-type: none"> • ampulliform to subglobose, constricted at the base, swollen in the middle, abruptly tapered at the end • conidium bearing tube: arising in divergent whorls of 2~6 on the terminal branches
Conidia	<ul style="list-style-type: none"> • subglobose to ovoid • smooth-walled • hyaline to pale green

lets(methylene proton(H-6), methine proton(H-8)) peaks를 나타내었다. PFG(pulsed field gradient)-HMQC(12) spectrum의 측정에 의해서 ¹H-와 ¹³C-NMR spectral data에서 관찰된 peak들의 assign 및

Table 2. ¹H and ¹³C NMR chemical shifts and coupling constants for MR304-1

Carbon No.	¹³ C chemical shifts in ppm*	¹ H chemical shifts in ppm*
1	52.0	3.75 (3H, s)
2	168.5	
3	121.0	6.16 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)
4	151.0	7.20 (1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)
5	81.5	
6	47.0	2.45 (1H, dd, <i>J</i> = 16.4, 1.2 Hz) 2.97 (1H, ddd, <i>J</i> = 16.4, 2.4, 1.5 Hz)
7	129.0	
8	132.0	6.07 (1H, ddd, <i>J</i> = 2.4, 2.4, 1.2 Hz)
9	84.0	4.36 (1H, dd, <i>J</i> = 2.4, 1.5 Hz)
10	168.8	

*Sample was dissolved in CD₃OD.

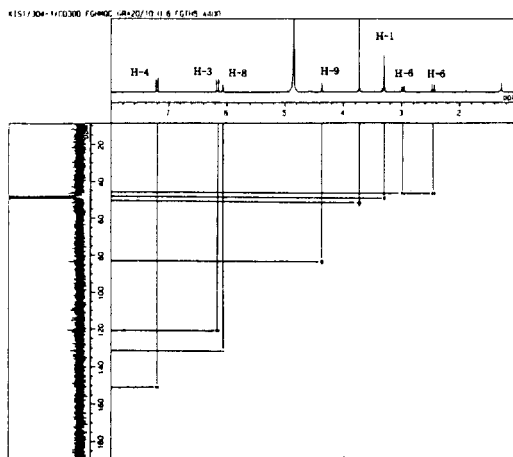


Fig. 1. PFG-HMOC spectrum of MR304-1.

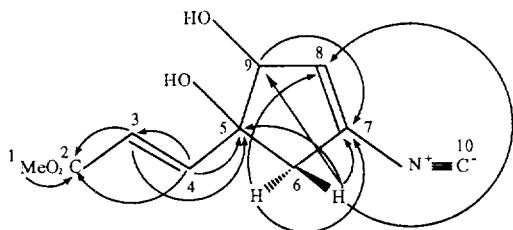


Fig. 2. Long-range C-H correlations observed in PFG-HMBC spectrum of MR304-1.

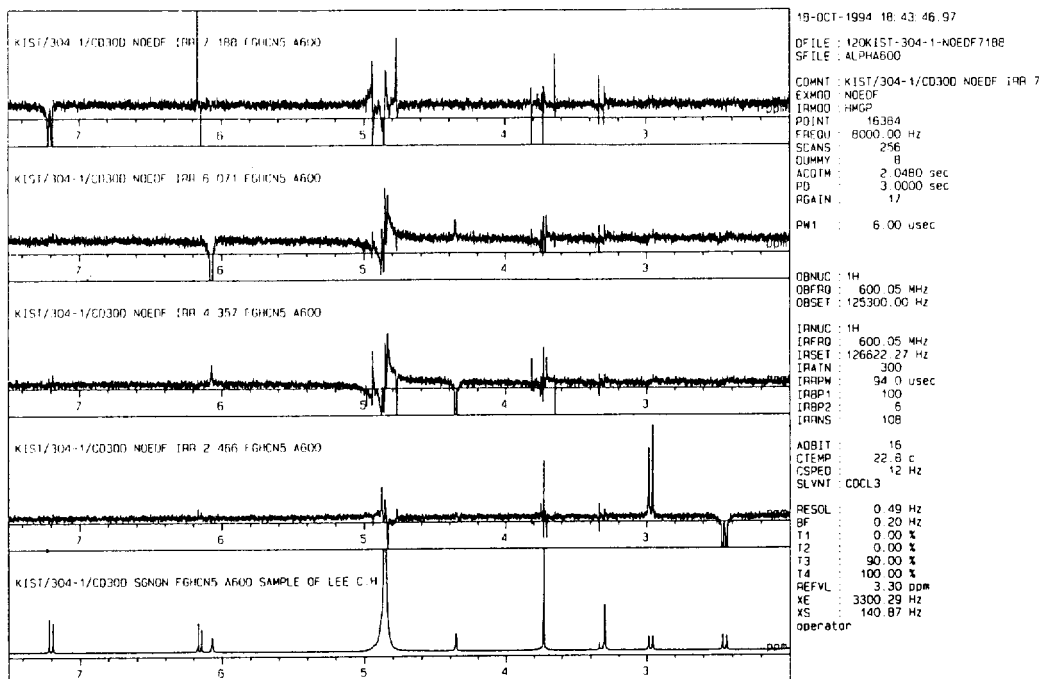


Fig. 3. NOE difference spectrum of MR304-1.

상호 연결관계를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과를 바탕으로 MR304-1은 trichoviridin type isonitrile antibiotics(13, 14)의 유도체라고 추정하였다. MR304-1의 평면 구조와 NMR assignment를 확인하기 위해서, PFG(pulsed field gradient)-HMBC(15)와 NOE difference spectra를 측정하였으며, 그 결과는 Figs 2, 3, 4에 나타내었다. Fig. 2의 HMBC data를 통해서 C-1 위치의 methoxy가 C-2, C-5, C-7의 가능한 위치 중 C-2와 연결되어 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 spectral data를 바탕으로 MR304-1의 평면구조는 3-(1,5-dihydroxy-3-isocyanocyclopent-3-enyl)prop-2-enoate의 물질로 결정되었다. 또한 3과 4의 orientation은 H-3와 H-4 사이의 coupling constant 값(15.6 Hz)으로부터 E-orientation으로 판명하였다.

MR304-1은 Baldwin 등(16)이 *Trichoderma hamatum*으로부터 분리하였다고 보고한 물질과 동일한 평면구조로 판명되었으나, 입체구조에 대한 연구는 없었던 바 MR304-1의 relative stereochemistry를 NOE data로 추정하였다. 즉, H-6(2.45 ppm), H-9(4.36 ppm), H-8(6.07 ppm), H-4(7.20 ppm)의 peaks를 irradiation 하였을 때(Fig. 3), 각각의 NOE difference 값을 측정하여 공간적인 거리를 추정하였고, 그 결과로부터 가장 가능성이 있는 relative stereochemistry를 추정할 수 있었다(Fig. 4). 입체구조의 확인을 위해서는 다양한 화학적 실험 및 X-ray 분석 등이 필요할 것으로 사료된다.

저해활성

MR304-1의 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 그 결과 MR304-1의 IC₅₀ 값이 0.25 µg/ml로 현재 미백 효과제로 사용중인 kojic acid(IC₅₀: 10 µg/ml)보다 더 강력한 저해활성을 나타내었다. MR304-1의 *Streptomyces bikiniensis* NRRL B-1049에 대한 melanin 생성 저해활

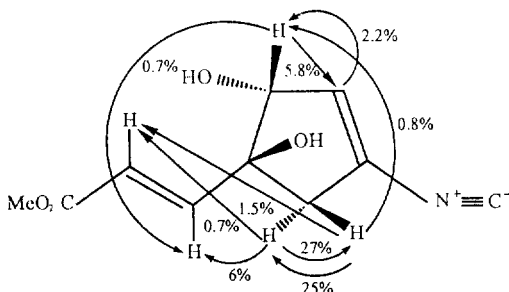


Fig. 4. NOE data with percentage of increase (possible stereochemistry).

성은 30 µg/paper disc 처리시에 1.5 cm 지름의 melanin 생성 저해환을 나타내었다. 이러한 저해활성은 같은 isonitrile 계열의 저해제인 MR93D(8)보다 낮은 활성이었다. 또한 B16 melanoma 세포의 melanin 생성에 대한 저해는 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 최소 저해농도(MIC) 0.05 µg/ml 이상에서 나타내었다. MR304-1은 kojic acid, arbutin 등의 저해제와 저해활성을 비교하여 볼 때, tyrosinase 저해활성에 비해 B16 melanoma 세포의 melanin 생성에 대한 저해활성이 특이적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 MR304-1이 *in vivo*에서도 활성을 나타낼 가능성을 높여주는 자료로, 이에 따라 기존 저해제와의 작용기작 차이점에 대한 비교연구가 필요할 것으로 판단된다.

MR304-1은 isocyanide기와 cyclopenten ring을 포함하는 구조로, 1985년 *Trichoderma hamatum*의 metabolite를 탐색하는 과정에서 분리되었다고 보고된 적이 있다(16). Cyclopenten isocyanide 계열물질은 *Trichoderma* sp.에 의해 tyrosine으로부터 생합성되며, rumen bacteria에 대해 항생역가를 나타내었다

Table 3. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase and melanin formation of *Streptomyces bikiniensis* and B16 melanoma cells

Compound	<i>S. bikiniensis</i>	B16	Mushroom
	NRRL B-1049*	Melanoma	tyrosinase
	Inhibition zone (cm)	MIC (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
MR304-1	1.5	0.05	0.25
MR93D	3.5	ND**	0.03
kojic acid	0	15.0	10.0
hydro-quinone	2.5	ND**	1.0
arbutin	ND**	10.0	15.0
p-methoxy-phenol	3.0	ND**	15.0

*Compound 30 µg/paper disc, **Not determined

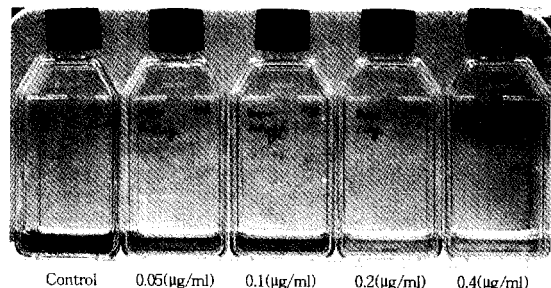


Fig. 5. Inhibitory effect of MR304-1 on melanin biosynthesis of B16 melanoma cells.

(17, 18). 또한 isocyanide 계열 물질인 trichoviridin (19)과 MR93D(8)가 melanin 생합성 저해효과를 나타낸다는 사실이 알려졌다. MR304-1의 활성 및 stereochemistry에 관한 연구는 없었던 바, 본 보고가 MR304-1의 relative stereochemistry 및 활성에 대한 최초의 보고이다.

요 약

미생물 배양액으로부터 melanin 생합성 저해물질을 탐색하던 중 mushroom tyrosinase를 저해하며 *Streptomyces bikiniensis*의 melanin 생합성을 저해하는 균주를 선발하였다. 그 균주가 생산하는 활성물질을 분리정제한 후 구조를 결정하였고 melanin 생합성 저해활성을 조사하였다. 선발된 MR304 균주는 형태적, 배양적 특성 등을 조사한 결과, *Trichoderma harzianum*으로 분류되었다. 균 배양액으로부터 Diaion HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, Sephadex LH-20 column chromatography 및 HPLC 등을 통하여 활성물질 MR304-1을 정제한 후 UV, ESIMS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, NOE, HMQC, HMBC 등의 기기분석을 한 결과, 활성물질 MR304-1의 구조는 3-(1,5-dihydroxy-3-isocyanocyclopent-(E)-3-enyl)prop-2-enoate로 동정되었다. MR304-1의 mushroom tyrosinase에 대한 IC₅₀ 값은 0.25 µg/ml이었고, *S. bikiniensis*의 melanin 생성에 대해서는 paper disc 당 30 µg 농도에서 1.5 cm 지름의 저해환을 나타내었다. 또한 B16 melanoma 세포의 melanin 생성에 대한 최소저해농도는 0.05 µg/ml이었다.

참고문헌

- Bell, A.A. and M.H. Weeler. 1986. Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
- Lerner, A.B. and I.B. Fitzpatrick. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
- Korner, A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**: 1163-1165.
- Aroca, P., F. Solano, C. Salinas, J.C. Gracia-Borron and J.A. Lozano. 1992. Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J. Biochem.* **208**: 155-163.
- Tomita, K.N., N. Oda., M. Kamel., T. Miyaki and T. Oki. 1990. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* **12**: 1601-1605.
- Ishihara, Y., M. Oka, M. Tsumakawa, K. Yomita,

- M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Komish and T. Oki. 1991. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. *J. Antibiotics* **44**: 25-32.
- Komiyama K., S. Takamatsu, Y. Yakahashi, M. Shinose, M. Hayashi, H. Tanaka, Y. Iwai and S. Omura. 1993. New inhibitors of melanogenesis. OH-3084 K1 and K2. *J. Antibiotics* **46**: 1520-1525.
- 이충환, 전효곤, 정명철, 이호재, 배경숙, 고영희. 1995. *Trichoderma* sp. MR-93 균주가 생산하는 isocyanide 계열의 melanin 생성 저해물질. 산업미생물학회지 **23**: 209-213.
- 이충환, 전효곤, 서영배, 고영희. 1993. *Streptomyces* sp. 20747 균주가 생산하는 tyrosinase-inhibiting isoflavonoids. 산업미생물학회지 **21**: 139-143.
- Rifai, M.A. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**: 1-54.
- Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1980. *Composition of soil fungi*, Pp. 820-814. Academic press, London.
- Hurd, R.E. and B.K. John. 1991 Gradient-enhanced proton-detected heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **91**: 648-653.
- Boyd, R.K., A.J. McAlees, A. Taylor and J.A. Walter. 1991. Isolation of new isocyanide metabolites. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1461-1465.
- Turner, W.B. and D.C. Aldridge. 1983. *Fungal Metabolites II*, Pp. 474-484. Academic Press INC., London.
- Willker, W., D. Leibfritz, R. Kerssebaum and W. Bermel. 1993. Gradient selection in inverse heteronuclear collection spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **31**: 287-292.
- Baldwin, J.E., R.M. Adlington, J. Chondrogianni, M.S. Edenborough, J.W. Keeping and C.B. Ziegler. 1985. Structure and synthesis of new cyclopentenyl isonitriles from *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. agr. HLX 1379. *J. Chem. Soc Chem. Commun.* 816-817.
- Baldwin, J.E., H.S. Bansal, J. Chondrogianni, L. D. Field, A.A. Taha, V. Thaller, D. Brewer and A. Taylor. 1985. Biosynthesis of 3-(3'-isocyanocyclopent-2-enylidene)propionic acid by *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. agr. ⁺ ⁺ ⁺. *Tetrahedron*, 1931-1938.
- Edenborough, M.S. and R.B. Herbert. 1988. Naturally occurring isocyanides. *Nat. Pro. Rep.* **5**: 229-245.
- Hashimoto, R., S. Takahashi, K. Hamano, T. Mori and A. Nakawa. 1994. New method for screening the melanin biosynthesis inhibitor by using the Larval Haemolymph of the silkworm, *Bombyxmori*, and the inhibitory activity of trichoviridin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1725-1726.

(Received 5 July 1995)