

산업용 효소로써 티로시나아제 연구의 최근 동향

김혜린, 김현미, 최유성*

Recent Advances in Tyrosinase Research as An Industrial Enzyme

Hyerin Kim, Hyunmi Kim, and Yoo Seong Choi*

접수: 2014년 1월 9일 / 게재승인: 2014년 2월 7일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Tyrosinases catalyze the hydroxylation of mono-phenolic compounds and the conversion of *o*-diphenols to *o*-quinones. The enzymes are mainly involved in the modification of tyrosine into L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA) and DOPA/DOPAquinone-driven intermolecular cross-linking, which play the key roles of pigmentation to the cells. It is ubiquitously distributed in microorganisms, plants, and animals all around the nature world. They are classified as copper-containing dioxygen activating enzymes; two copper ions are coordinated with six histidine residues in their active sites and they are distinguished as met-, deoxy-, and oxy-form depending on their oxidative states. Natural extraction and recombinant protein approaches have been tried to obtain practical amounts of the enzymes for industrial application. Tyrosinases have been widely applied to industrial and biomedical usages such as detoxification of waste water containing phenolic compounds, L-DOPA as a drug of Parkinson's disease, biomaterials preparation based on the cross-linking ability and biosensors for the detection of phenolic compounds. Therefore, this review reports the mechanism of tyrosinase, biochemical and structural features and potential applications in industrial field.

Keywords: Enzyme, Tyrosinase, Monophenolase, Diphenolase

충남대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-5682, Fax: +82-42-822-8995
e-mail: biochoi@cnu.ac.kr

1. 서론

멜라닌 (melanin) 색소의 합성에 관여하는 핵심 효소로 널리 알려진 tyrosinase는 미생물에서 식물, 동물에 이르기까지 자연상에 널리 분포되어 있으며, 약 100년 이상의 오랜 기간 동안 연구가 진행되었다 [1]. 기본적으로 tyrosinase는, 리그닌의 분해에 관여하는 laccase 및 무척추동물의 호흡에 필요한 hemocyanin 등과 비슷하게 분류되며, 활성 부위 (active site)에 구리를 함유하고 있는 type-3 구리 효소(monophenol monooxygenase, EC. 1.14.18.1)로 알려져 있다 [2]. Tyrosinase는 멜라닌 생합성의 초기단계인 L-tyrosine (L-Tyr)을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 전환하고 L-DOPA를 Dopakinone으로 변환하는 촉매로, 멜라닌의 생합성 초기 단계에 중요하게 관여하고 있다. 기본적으로 멜라닌은 세포를 자외선과 활성 산소 그리고 독성을 띄는 중금속으로부터 보호하는 역할을 한다 [3,4]. Tyrosinase에 기반한 멜라닌화 반응은 사과, 감자, 바나나와 같은 식물이 절단되어 공기 중에 노출되었을 때 절단면의 갈변 현상을 일으키는 등의 방식으로 상처 치료 및 1차 면역 반응에 관여한다 [5,6]. 동물의 경우, 피부, 털, 눈동자의 색깔에 영향을 주고 피부의 갈색 색소 침착 또는 상처 부위의 경화에 관여하기도 한다 [7,8]. 또한, tyrosinase는 다양한 형태의 monophenolic 또는 diphenolic 화합물을 반응 기질로 사용하여 quinone으로 전환하는 데 사용할 수 있다 [2,9]. 따라서 tyrosinase는 멜라닌화를 위한 phenolic 화합물의 산화 반응을 촉매할 뿐만 아니라, 폐놀을 함유하는 폐수나 오염수의 정화 [10], lincomycin과 같은 항생제의 생합성 [11], 파킨슨 질환 치료제 등의 의약품 재료로 활용될 수 있는 L-DOPA의 생산 [1], phenolic 화합물의 양을 측정하기 위한 biosensor [12], 단백질 및 당의 가교 (cross-linking) [13] 등에 활용되고 있다. 이러한 측면에서, 본 논문에서는 전반

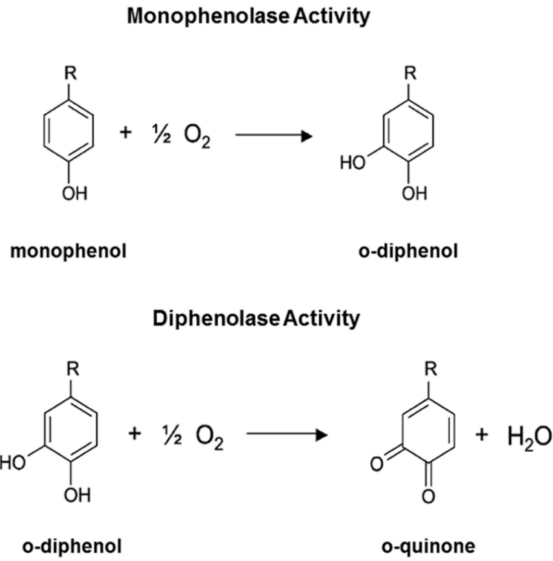


Fig. 1. Catalytic activity of tyrosinase [14].

적인 tyrosinase의 반응 메커니즘 및 이에 기반한 생화학적 특성과 구조적 특성을 박테리아 유래의 tyrosinase를 중심으로 기술하고, 산업적 측면에서 tyrosinase의 생산과 활용 분야를 서술하려 한다.

2. Tyrosinase 반응

2.1. Tyrosinase의 반응 메커니즘

앞에서 간략히 언급하였듯이, tyrosinase는 monophenol의 hydroxylation 과정을 포함하는 monophenolase 반응과, *o*-diphenol의 *o*-quinone으로의 변환을 수반하는 diphenolase 반응을 촉매하며, tyrosine, DOPA, tyramine, phenol, pyrocatechol 등 다양한 형태의 상대적으로 넓은 스펙트럼의 물질을 반응 기질로 사용할 수 있다 (Fig. 1) [14]. Tyrosinase의 활성 부위 (active site)는 반응 기질인 phenolic 화합물과 산소와 상호작용하며, 산화된 수준에 따라 세 가지 형태의 oxy-tyrosinase, met-tyrosinase, deoxy-tyrosinase로 구분된다 [15,16]. oxy-ty-

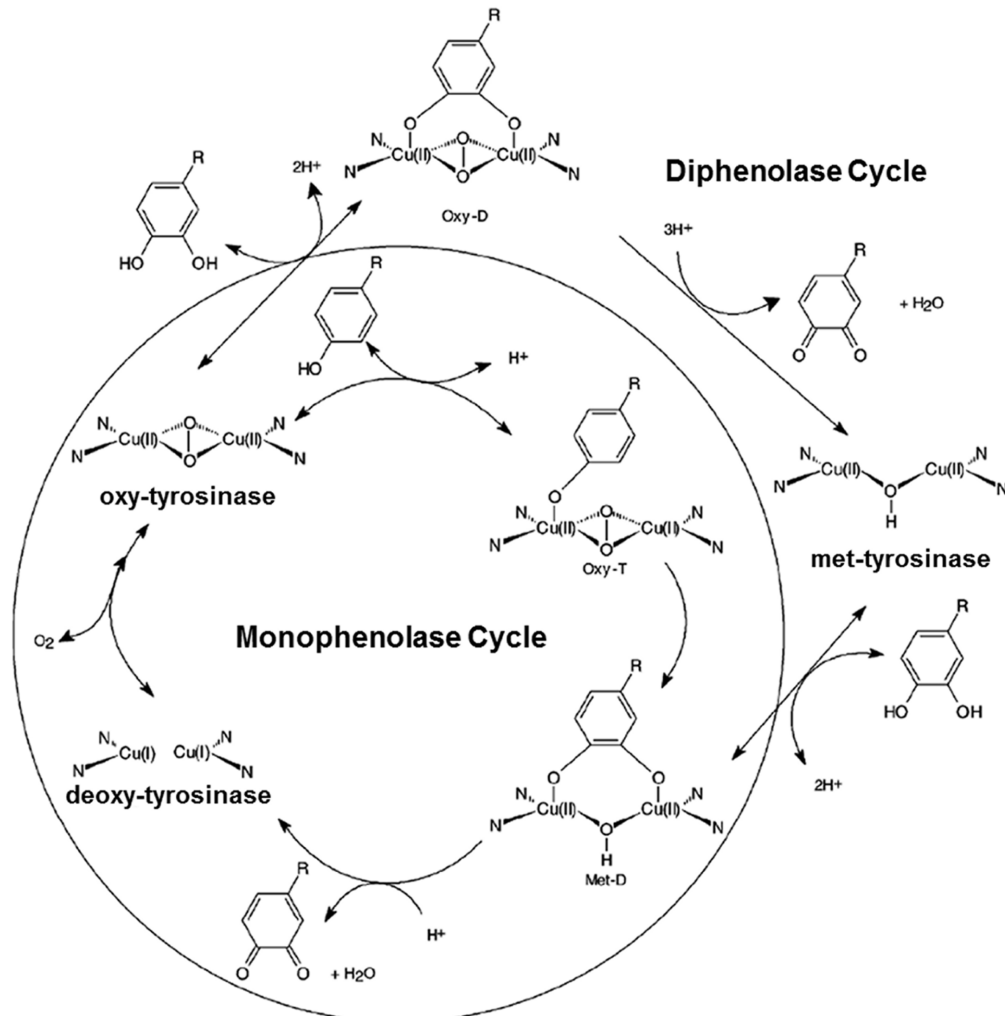


Fig. 2. Mechanism for monophenolase and diphenolase activity of tyrosinase [15].

rosinase는, 여섯 개 히스티딘 (histidine) 잔기의 질소와 두 개의 구리 (II) 이온이 산소와 결합하여 생성된 정방정계 구조의 활성부위를 갖는 형태로, monophenol을 기질로 활용하여 diphenol로 전환하는 반응에 관여하거나 diphenol과 결합하여 quinone을 생성하고, 그 자신은 met-tyrosinase의 형태로 변환된다. Met-tyrosinase는 활성부위의 구조가 oxy-tyrosinase와 비슷하지만 두 개의 구리 (II) 이온에 산소 대신 수산기가 연결되어 있고, diphenol을 quinone으로 전환한 후 그 구조가 deoxy-tyrosinase의 형태로 변환된다. 마지막으로 deoxy-tyrosinase는 산소 또는 수산기가 결합되어 있지 않은 Cu (I)-Cu (I) 형태로, 이후 효소가 활성을 띠기 위해 산소와 결합하여 oxy-tyrosinase로 구조가 바뀐다. 전반적으로 정제된 tyrosinase 용액에서 약 85% 정도 수준이 met-tyrosinase, 약 15% 정도가 oxy-tyrosinase 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다 [17]. 따라서 monophenol을 기질로 하여 반응을 수행할 경우 초기에 lag phase가 나타나기도 한다. 전체적인 tyrosinase의 반응 메커니즘은 Fig. 2에 나타내었다 [15].

2.2. Tyrosinase 생화학적 특성

많은 생명체에서 멜라닌 생합성과 관련된 tyrosinase의 유전자 서열이 알려졌음에도 불구하고, 정제된 tyrosinase의 생화학적 특성에 대한 정보는 상대적으로 많이 알려져 있지 않다. 보통 tyrosinase 유전자를 갖고 있는 생명체의 유전체는 하나 이상의 tyrosinase 유전자를 갖고 있으며, 각각의 tyrosinase는 생화학적 특성이 다르다. 예를 들어 방선균으로부터 생산되는 대표적인 tyrosinase인 MelC2와 MelD2의 경우, MelC2는 세포 밖으로 분비되고 효소는 다양한 여러 기질에서 활성을 띄고 있는데 반하여, MelD2는 세포 안에서 발현되면서 그 기질특이성이 매우 높다 [16,18]. 전체적으로 볼 때, 일부 100°C 이상의 매우 높은 온도에서 활성을 띄거나 [19], 유기용매가 있을 때 더욱 활성이 좋은 tyrosinase가 보고되고 있으나 [20], 대체적으로 tyrosinase는 박테리아의 경우 monomeric 단백질로 분자량이 약 20~60 kDa 정도되고, 수용액 상에서 넓은 pH 및 온도 영역에서 활성을 띄고 있으며, 약 7.5의 최적 pH와 40°C에서 반응 최적 온도를 갖고 있다 [16].

최근 박테리아에 존재하는 tyrosinase는, 효소가 활성을 띄기 위해 caddie 단백질로 불리는 추가적인 단백질의 필요 여부와 tyrosinase의 도메인 구성에 따라, 5가지 type으로 분류되고 있다 [1]. Type I tyrosinase는 몇몇 방선균에 존재하는 것으로 보고되고 있고, 산소와 결합하는 하나의 motif, 구리와 결합하는 두 개의 motif, 그리고 아직까지 메커니즘이 명확하게 밝혀지지 않았지만, 외부로의 분비, 정확한 단백질 folding, 활성자리로의 구리 원자의 조립을 위해 필요한 caddie 단백질로 구성되어 있다 [21,22]. Type II tyrosinase는 바실러스 균주에서 주로 발견되었고, tyrosinase의 전체적인 구조는 type I과 매우 유사하지만 추가적인 caddie 단백질이 없어도 효소가 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [20,23]. Type III tyrosinase는 우미균류에서 발견되며, type I에서의 caddie 단백질을 요구하지 않지만, 몇몇 식물 또는 균류에서 보고되

는 추가적인 C-terminal 도메인을 갖고 있어 세포 내에서 효소 활성을 조절하는 것으로 판단되고 있으며, C-terminal 도메인을 제거하였을 때 효소 활성이 약 100배 정도 증가하는 것으로 알려졌다 [24,25]. Type IV tyrosinase는 이전에 보고된 tyrosinase와 달리 단지 하나의 구리와 결합하는 motif만이 존재하여 여전히 tyrosinase인지 더 많은 논의가 필요하지만 tyrosinase의 활성 특성을 갖고 있어 tyrosinase로 분류되었다. 보고되는 tyrosinase 중에서 가장 작은 크기이며 homodimer로 상대적으로 열 안정성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 [26]. Type V tyrosinase는 전형적인 tyrosinase의 서열 특성을 갖고 있지 않고 오히려 laccase와 비슷하다. 하지만 type IV와 마찬가지로 tyrosinase와 같은 반응 특성을 갖고 있어 tyrosinase로 분류되었다 [27,28]. Fig. 3은 박테리아 유래 tyrosinase의 다섯 가지 type에 대해 도식으로 나타내었다 [1].

2.3. Tyrosinase 구조적 특성

지금까지 구조가 밝혀진 tyrosinase는 방선균 (*Streptomyces castaneoglobisporus*), 바실러스 (*Bacillus megaterium*), 버섯 (*Agaricus bisporus*), 누룩곰팡이 (*Aspergillus oryzae*) 유래의 tyrosinase의 네 가지이다. 방선균 유래 tyrosinase는 type I 형태로 추가적인 caddie 단백질이 결합되어 있고, 구리가 없거나 있을 때, oxy-tyrosinase, met-tyrosinase, deoxy-tyrosinase 등 다양한 조건에서 고해상도의 3차원 구조가 모두 밝혀졌다 [29,30]. 전체적인 3차 구조는 tyrosinase의 경우 α -helix로 이루어져 있고 (Fig. 4A), caddie 단백질은 한 가닥의 α -helix와 여섯 가닥의 β -sheet로 구성되어 있다 (Fig. 4B). 그리고, 활성 부위를 보면 앞에서 언급 하였듯이, 두 개의 구리 이온 사이에 산소가 결합하여 oxy-tyrosinase를 형태를 구성하고 (Fig. 4C), 두 개의 구리 이온은 각각 세 개의 histidine 잔기가 보존된 copper binding site에 의해서 안정적으로 구조를 유지한다 (Fig. 4D). 한편, *S. antibioticus* tyrosinase 서열에서 대표적으로 보이는 PYWDW 형태의 motif는 반응에 필요한 산소의 결

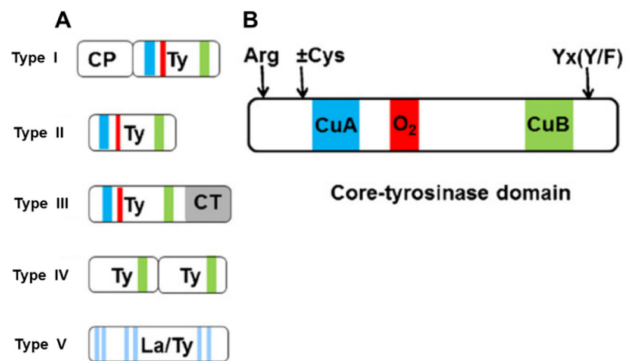


Fig. 3. Types of bacterial tyrosinases (A) and the typical domain architecture of the active core domain (B). CP: caddie protein, Ty: tyrosinase, CT: C-terminal extension, La/Ty: laccase-like tyrosinase, CuA in blue color: copper binding motif A, CuB in green color: copper binding motif B, O₂ in red color: oxygen binding motif, light blue color: typical copper binding sites of laccases [1].

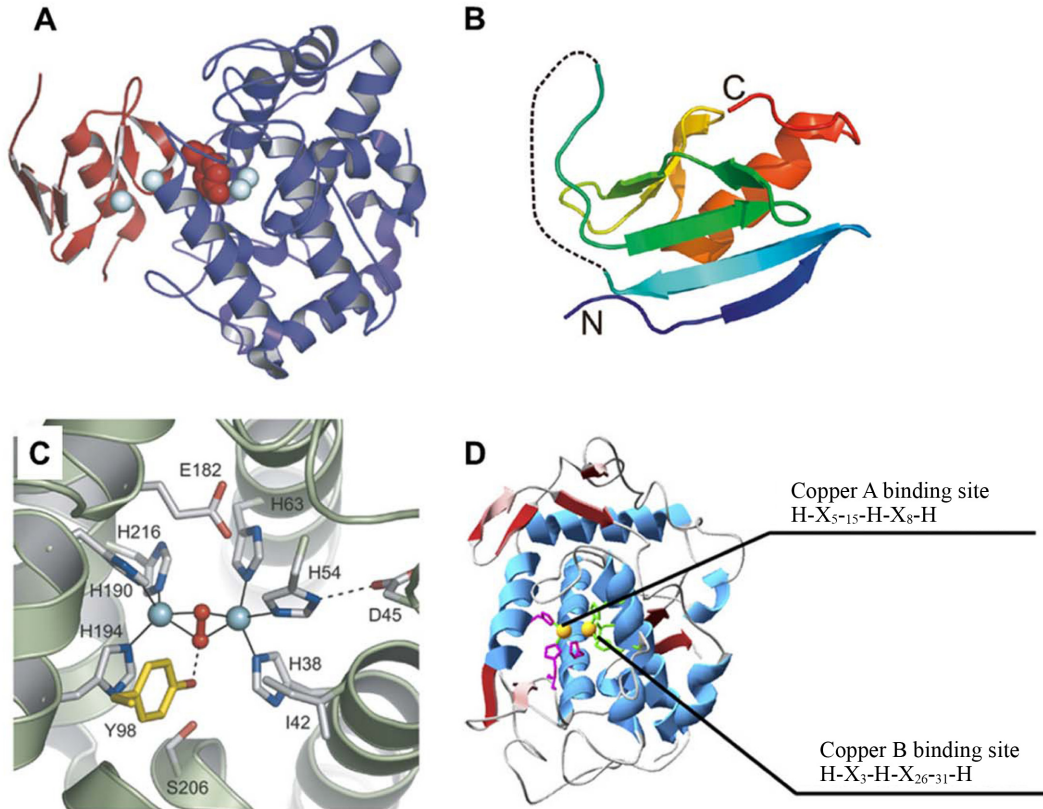


Fig. 4. Three-dimensional structure of tyrosinases. (A) Overall structure of tyrosinase (blue) from *Streptomyces castaneoglobisporus* in complex with the caddie protein of ORF378 (red) [53]. (B) The caddie protein of ORF378 [54]. (C) Active site of tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus* with coordinated O_2 [53]. (D) Overall structure of tyrosinase from *Bacillus megaterium* and characteristic sequence motifs of tyrosinases [16].

합에 관여하는 것으로 조사되었으며, 일부 서열의 차이는 있으나 다른 균주들에서도 공통적으로 나타나고 있다 [16]. 또한, C-terminal domain이 존재하는 박테리아와 진핵생물 tyrosinase에서는 Y×(Y/F) motif가 보존되고 있는데, 이는 tyrosinase의 N-terminus 근처의 아르기닌 (arginine) 잔기와 수소결합을 형성하여 caddie 단백질이 해리되거나 C-terminal domain이 제거된 tyrosinase를 안정화하는데 관여하는 것으로 여겨지고 있다 [1,25]. 그리고, 시스테인 (cysteine) 잔기가 N-terminal 쪽의 첫 번째 copper-binding site를 안정화하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보여지는데, 이러한 시스테인은 *S. castaneoglobisporus*와 *B. megaterium* tyrosinase에서는 발견되지 않고, *A. oryzae* 및 *V. spinosum* tyrosinase에서는 보여진다 [1].

3. Tyrosinase의 생산

현재 상업적으로 활용되고 있는 tyrosinase는 Sigma회사에서 판매하고 있는 버섯 유래의 *A. bisporus* tyrosinase로 추출에 의해서 생산되고 있다 [31]. 산업적 측면에서 tyrosinase를 효율적으로 얻기 위해서는, 고체상 및 액체상 배지에서 tyrosi-

nase의 과발현을 유도하는 배양 조건을 알아야 한다. 기본적으로 tyrosinase는 세포가 열 또는 높은 삼투압과 같은 외부의 스트레스를 받을 때, 반응 기질인 tyrosine 및 중요한 금속 조효소인 구리가 존재하는 상황에서 생산되는 것으로 알려져 있다 [16]. 지금까지 보고된 문헌자료를 보면, 생산성 측면에서 *Pycnoporus* 종을 이용한 액체 배지에서의 배양으로부터 45 U/(g·day)의 monophenolase 활성과 164 U/(g·day)의 diphenolase 활성을 갖는 추출물이 얻어졌다 [32]. 한편, 효율적인 발현을 위한 외래 균주에 버섯 유래 tyrosinase 유전자를 도입하여 생산하였을 때 534 U/L의 monophenolase 활성과 1.67 U/L의 diphenolase 활성을 갖는 배양액을 얻기도 하였다 [33].

한편, 아직까지 상업화되지는 않았지만, 박테리아 유래 다양한 종류의 tyrosinase 또한 마찬가지로 해당 유전자를 갖고 있는 균주로부터 직접 추출하여 얻어내거나 외래 균주에서 재조합 단백질로 생산되고 있다. 대표적인 예로, 천연 tyrosinase 생산 균주로서 *S. albul* 균주 배양액으로부터 0.2 mg/L의 정제된 tyrosinase가 얻어졌고 [34], *S. antibioticus* 유래의 tyrosinase는 원 균주로부터 약 20 mg/L의 tyrosinase가 얻어졌다 [35]. 또한 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 *B. megaterium* 유래의 tyrosinase가 약 86 mg/L, *V. spinosum* 유래의 tyrosinase가 약 20 mg/L, *S. REN-21* 유래 tyrosinase가

Table 1. Examples of the production of tyrosinases

Original organism	Feature	Productivity	Reference
<i>Pycnoporus sanguineus</i> CBS 614.73	Liquid culture of the original organism, Crude extract	45 U/(g·day) monophenolase	32
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BRFM49	Recombinant production in <i>Aspergillus niger</i> , Culture broth	534 U/L monophenolase	33
<i>Streptomyces albus</i>	Liquid culture of the original organism, Purified enzyme	0.2 mg/L	34
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Liquid culture of the original organism, Purified enzyme	20 mg/L	35
<i>Bacillus megaterium</i>	Recombinant production in <i>Escherichia coli</i> , Purified enzyme	86 mg/L	20
<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	Recombinant production in <i>Escherichia coli</i> , Purified enzyme	20 mg/L	24
<i>Streptomyces</i> REN-21	Recombinant production in <i>Escherichia coli</i> , Purified enzyme	54 mg/L	36

Table 2. Representative applications of tyrosinases in industrial aspects

Field	Applications
Materials	Melanin biosynthesis for therapeutic uses and dye
	L-DOPA production for medical applications
	Preparation of underwater adhesive materials
	Biosynthesis of therapeutic natural compounds
	Poly-phenolic biopolymers
Biosensors	Modification of existing materials
	Detection and quantification of catechol-producing compounds such as adrenaline and cyanogenic glycoside
Bioremediation	Detoxification of phenolic and substituted phenolic compounds
	Decolorization of dye

약 54 mg/L 각각 얻어졌다 [20,24,36]. 이러한 측면에서, 지금까지 설명한 tyrosinase의 생산에 대한 예들을 Table 1에 정리하였다.

4. Tyrosinase의 산업적 활용

앞에서 tyrosinase의 반응 특성을 살펴 보았듯이, tyrosinase는 기본적으로 상온, 상압의 조건에서 환경친화적으로 다양한 phenolic 화합물의 산화 반응을 촉매하며, 이어지는 일련의 cross-linking 반응에 관여한다. 따라서 tyrosinase는 phenolic 화합물이 포함되어 있는 산업적으로 인체에 직접적으로 활용 가능한 기능성 의약품 또는 생체재료의 생산에 활용될 수 있고, 다양한 형태의 극미량 phenolic 화합물의 검출과 정량에 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 환경에 유해한 독성을 띠는 phenolic 화합물의 환경 정화 공정에 특화되어 이용될 수 있다. Table 2는 tyrosinase의 대표적인 산업적 활용 예를 정리하였으며, 구체적으로 다음과 같은 분야에 활용될 수 있다.

우선 tyrosinase의 가장 기본적인 활용의 예는 멜라닌 생합성이다. tyrosinase의 산화 반응으로 만들어지는 멜라닌은 원핵생물, 진핵생물을 통틀어서 eumelanin, pheomelanin, allomelanin의 세 종류로 나뉜다 [37]. 구체적으로 멜라닌의 종류별 특징을 살펴보면, eumelanin의 경우 검은색 또는 갈색을

띠고 멜라닌 분자에 질소 원자를 포함하고, pheomelanin의 경우 황적색을 띠고 황 원소를 포함한다. allomelanin은 멜라닌 중에서 heterologous group의 중합체가 가장 많이 존재하지만, 현재 연구보고가 많이 되지 않은 상태이다. 멜라닌은 단순히 색소라고 하기에는 다양한 기능을 갖고 있다. 기본적으로 넓은 파장대의 빛을 흡수 또는 산란시킬 수 있기 때문에 태양 조사로부터 세포를 보호할 수 있다 [1,37]. 그 뿐 아니라 멜라닌은 산화 환원 반응이 일어날 때 전자를 전달하는 역할을 하여 생명체 내에서 전자전달과정을 조절하는 데 활용된다 [38]. 또한 머리카락과 같은 동물성 섬유의 염색에 이용될 수 있다고 제안되고 있다 [39].

다음으로, 의약품, 플라스틱, 항산화제, 농화학물질의 합성에 필요한 핵심 중간체로 *o*-diphenol은 많이 활용되므로, 이러한 분야에 tyrosinase의 활용 가능성은 매우 높다. 우선적으로 tyrosinase에 의해서 얻을 수 있는 DOPA는 파킨슨 질환에 대한 주요한 약물로 사용될 수 있으며, 현재는 화학적으로 합성되어서 산업적으로 이용되지만, tyrosinase를 이용한 생물 공정으로도 그 생산 가능성이 보고되고 있다 [40,41]. Tyrosinase 반응은 coumestan과 같은 estrogenic activity를 보이는 천연물 합성에 활용되기도 하였다 [42]. 뿐만 아니라, tyrosinase는 표면에 노출되어 있는 tyrosine을 산화시켜 cross-linking 할 수 있는 활성을 지니고 있어 단백질과 키토산과 같은 물질을 가교하여 기능성을 더욱 부가하거나 바이오소재 제

조에 활용될 수 있다 [43]. Tyrosinase에 의해서 결합된 실크 단백질과 키토산 복합체는 소재의 입자크기를 더 작게 하고, 높은 열 안정성 및 접착력의 변화로 의료용 소재로 활용될 가능성이 보여진다 [44,45]. 또한, 비슷하게 tyrosinase는 실크단백질과 콜라젠, elastin, 젤라틴 등과의 가교를 촉매할 뿐만 아니라 [46,47], 재조합 융합접착단백질과 같은 생체 접착 물질에 높은 접착능력을 부여하는 것도 가능하다 [48,49].

Tyrosinase는 pico 몰 이하 농도의 방향족 물질의 양을 측정하는 데에도 활용될 수 있다. Tyrosinase는 다양한 기질을 산화시킬 수 있어서, biosensor 분야에서 다양한 mono-, diphenolic 성분을 검출하는데 활용이 크다고 제안되고 있지만, tyrosinase의 기질 특이성이 낮아, 서로 다른 2개의 기질이 있을 경우에 각각의 활성을 구별하기는 어렵다. 구체적으로 *S. antibioticus* 유래의 tyrosinase에 기반을 둔 biosensor는 우수한 sensitivity로 인해 극미소량 (5 nM)에서도 L-DOPA, adrenaline와 같은 catechol 성분을 검출할 수 있다고 보고되었다 [12]. 또한, tyrosinase와 β -galactosidase의 반응을 이용하여 음식물에 존재하는 몸에 해로운 cyanogenic glycoside를 검출하는 데에도 사용될 수 있으며 [50], 과일 주스 및 차에 존재하는 방향족 물질의 양을 결정하는 데에도 활용될 수 있다 [49]. Tyrosinase는 산업 오염 물질인 chlorophenol과 fluorophenol, p-cresol, azo dye 등의 산화를 통해 독성을 제거하는 데 이용되는 등 폐수에 존재하는 방향족 물질의 독성을 제거하는 데에도 활용될 가능성이 있다 [51,52].

5. 결론

Tyrosinase는 다양한 생명체의 멜라닌 생합성 초기 단계에 활용되는 핵심효소로서, 다양한 기질에 대한 monophenolase 반응과 diphenolase 반응을 촉매하므로 그 산업적 이용 가치는 높다. 최근 tyrosinase에 대한 3차원 구조가 밝혀져 보고되기 시작하고 있고, 반응 메커니즘과 생화학적 특성이 더욱 명확하게 이해되고 있어, 높은 활성과 안정성 및 다양한 반응 특이성을 갖는 효소의 재설계 연구개발 가능성이 더욱 높아지고 있다. 또한, 해양 무척추 생명체에서 L-DOPA 역할의 중요성이 부각되고 있어, 해양생명체 유래의 tyrosinase 유전자원에 대한 관심이 증대되고 있다. 한편, 급격히 발전하고 있는 세포배양 기술, 유전공학 적 대량생산 기술, 분리정제 기술의 개발로 인해, 아직까지 상업적 생산이 한 가지에 머물고 있는 tyrosinase의 경제적인 생산이 가속화 될 것으로 판단된다. 이러한 측면에서, tyrosinase의 반응 특성을 정확하게 이해하고 공학적 측면에서 효율적으로 생산할 수 있다면, 지금까지 보고된 phenolic 화합물의 산화반응 촉매, L-DOPA의 생산, phenolic 화합물 농도 측정을 위한 biosensor 등의 산업적 활용뿐만 아니라, 인류의 삶의 질 향상을 위한 다양한 바이오 소재 생산을 포함한 생명공학 분야에 적용될 수 있을 것이다.

감사

본 연구는 2012년도 충남대학교 학술연구비와 한국연구재단 (NRF-C1ABA001-2011-0029960, NRF-2012R1A1A1003516)의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fairhead, M. and L. Thony-Meyer (2012) Bacterial tyrosinases: Old enzymes with new relevance to biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 29: 183-191.
2. Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2606.
3. Geng, J., S. B. Yu, X. Wan, X. J. Wang, P. Shen, P. Zhou, and X. D. Chen (2008) Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70: 1151-1155.
4. Garcia-Rivera, J., and A. Casadevall (2001) Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.* 39: 353-357.
5. Pawelek, J. M. and A. M. Korner (1982) The biosynthesis of mammalian melanin. *Am. Sci.* 70: 136-145.
6. Van Gelder, C. W., W. H. Flurkey, and H. J. Wichers (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45: 1309-1323.
7. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* 75: 122-127.
8. Garcia-Borron, J. C. and F. Solano (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: Beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell. Res.* 15: 162-173.
9. Lerch, K. and L. Ettinger (1972) Purification and characterization of a tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Eur. J. Biochem.* 31: 427-437.
10. Pintero, S., J. Rivera, D. Romero, M. A. Cevallos, A. Martinez, F. Bolivar, and G. Gosset (2007) Tyrosinase from *Rhizobium etli* is involved in nodulation efficiency and symbiosis-associated stress resistance. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 35-44.
11. Michalik, J., W. Emilianowicz-Czerska, L. Switalski, and K. Raczynska-Bojanowska (1975) Monophenol monooxygenase and lincomycin biosynthesis in *Streptomyces lincolnensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 526-531.
12. Streffer, K., E. Vijgenboom, A. W. J. W. Tepper, A. Makower, F. W. Scheller, G. W. Canters, and U. Wollenberger (2001) Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *Anal. Chim. Acta.* 427: 201-210.
13. Lewandowski, A. T., D. A. Small, T. Chen, G. F. Payne, and W. E. Bentley (2006) Tyrosine-based "activatable pro-tag": Enzyme-catalyzed protein capture and release. *Biotechnol. Bioeng.* 93: 1207-1215.
14. Claus, H., and H. Decker (2006) Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 3-14.
15. Likhitwitayawuid, K. (2008) Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci. India* 94: 44-52.

16. Faccio, G., K. Kruus, M. Saloheimo, and L. Thony-Meyer (2012) Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochem.* 47: 1749-1760.
17. Chang, T. S. (2009) An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475.
18. Yang, H. Y., and C. W. Chen (2009) Extracellular and intracellular polyphenol oxidases cause opposite effects on sensitivity of *Streptomyces* to phenolics: A case of double-edged sword. *PLoS One.* 4: e7462.
19. Kong, K. H., M. P. Hong, S. S. Choi, Y. T. Kim, and S. H. Cho (2000) Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 31: 113-118.
20. Shuster, V., and A. Fishman (2009) Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Microb. Biotech.* 17: 188-200.
21. Betancourt, A. M., V. Bernan, W. Herber, and E. Katz (1992) Analysis of tyrosinase synthesis in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 787-794.
22. Kohashi, P. Y., T. Kumagai, Y. Matoba, A. Yamamoto, M. Maruyama, and M. Sugiyama (2004) An efficient method for the over-expression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobosporus*. *Protein Expres. Purif.* 34: 202-207.
23. Sendovski, M., M. Kanteev, V. S. Ben-Yosef, N. Adir, and A. Fishman (2010) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a bacterial tyrosinase from *Bacillus megaterium*. *Acta Crystallogr. F.* 66: 1101-1103.
24. Fairhead, M., and L. Thony-Meyer (2010) Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS J.* 277: 2083-2095.
25. Flurkey, W. H., and J. K. Inlow (2008) Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.* 102: 2160-2170.
26. Liu, N., T. Zhang, Y. J. Wang, Y. P. Huang, J. H. Ou, and P. Shen (2004) A heat inducible tyrosinase with distinct properties from *Bacillus thuringiensis*. *Let. Appl. Microbiol.* 39: 407-412.
27. Sanchez-Amat, A., P. Lucas-Elio, E. Fernandez, J. C. Garcia-Borron, and F. Solano (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Mariomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1547: 104-116.
28. Sakurai, T., and K. Kataoka (2007) Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* 7: 220-229.
29. Matoba, Y., T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitsu, and M. Sugiyama (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* 281: 8981-8990.
30. Matoba, Y., N. Bando, K. Oda, M. Noda, F. Higashikawa, T. Kumagai, and M. Suqiyama (2011) A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *J. Biol. Chem.* 286: 30219-30231.
31. De Faria, R. O., V. R. Moure, M. A. L. D. Amazonas, N. Krieger, and D. A. Mitchell (2007) The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotech.* 45: 287-294.
32. Halaouli, S., M. Asther, K. Kruus, L. Guo, M. Hamdi, J. C. Sigouillot, M. Asther, and A. Lomascolo (2005) Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* 98: 332-343.
33. Selinheimo, E., M. Saloheimo, E. Ahola, A. Westerholm-Parvinen, N. Kalkkinen, J. Buchert, and K. Kruus (2006) Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEBS J.* 273: 4322-4335.
34. Dolashki, A., A. Gushterova, W. Voelter, and B. Tchorbanov (2009) Purification and characterization of tyrosinases from *Streptomyces albus*. *Z. Naturforsch C.* 64: 724-732.
35. Bubacco, L., E. Vijgenboom, C. Gobin, A. W. J. W. Tepper, J. Salgado, and G. W. Canters (2000) Kinetic and paramagnetic NMR investigations of the inhibition of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase. *J. Mol. Catal. B. - Enzym.* 8: 27-35.
36. Ito, M., and K. Inouye (2005) Catalytic properties of an organic solvent-resistant tyrosinase from *Streptomyces sp* REN-21 and its high-level production in *E. coli*. *J. Biochem.* 138: 355-362.
37. Plonka, P. M. and M. Grabacka (2006) Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol.* 53: 429-443.
38. Menter, J. M., and I. Willis (1997) Electron transfer and photoprotective properties of melanins in solution. *Pigm. Cell Res.* 10: 214-217.
39. Tsujino, Y., Y. Yokoo, and K. Sakato (1991) Hair coloring and waiving using oxidases. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 42: 273-282.
40. Tuncagil, S., S. K. Kayahan, G. Bayramoglu, M. Y. Arica, and L. Toppare (2009) L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *J. Mol. Catal. B - Enzym.* 58: 187-193.
41. Pialis, P. and B. A. Saville (1998) Production of L-DOPA from tyrosinase immobilized on nylon 6,6: enzyme stability and scaleup. *Enzyme Microb. Tech.* 22: 261-268.
42. Pandey, G., C. Muralikrishna, and U. T. Bhalerao (1989) Mushroom tyrosinase catalyzed synthesis of coumestans, benzofuran derivatives and related heterocyclic-compounds. *Tetrahedron.* 45: 6867-6874.
43. Chen, T. H., R. Vazquez-Duhalt, C. F. Wu, W. E. Bentley, and G. F. Payne (2001) Combinatorial screening for enzyme-mediated coupling. Tyrosinase-catalyzed coupling to create protein-chitosan conjugates. *Biomacromolecules* 2: 456-462.
44. Anghileri, A., R. Lantto, K. Kruus, C. Arosio, and G. Freddi (2007) Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *J. Biotechnol.* 127: 508-519.
45. Kang, G. D., K. H. Lee, C. S. Ki, J. H. Nahm, and Y. H. Park (2004) Silk fibroin/chitosan conjugate crosslinked by tyrosinase. *Macromol. Res.* 12: 534-539.
46. Jus, S., V. Kokol, and G. M. Guebitz (2009) Tyrosinase-catalysed coating of wool fibres with different protein-based biomaterials. *J. Biomat. Sci. Polym. E.* 20: 253-269.
47. Freddi, G., A. Anghileri, S. Sampaio, J. Buchert, P. Monti, and P. Taddei (2006) Tyrosinase-catalyzed modification of Bombyx mori silk fibroin: Grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions. *J. Biotechnol.* 125: 281-294.
48. Choi, Y. S., D. G. Kang, S. Lim, Y. J. Yang, C. S. Kim, and H. J. Cha (2011) Recombinant mussel adhesive protein fp-5 (MAP fp-

- 5) as a bulk bioadhesive and surface coating material. *Biofouling*. 27: 729-737.
49. Girelli, A. M., T. Giuliani, E. Mattei, and D. Papaleo (2009) Determination of an antioxidant capacity index by immobilized tyrosinase bioreactor. *J. Agr. Food Chem.* 57: 5178-5186.
50. Tatsuma, T., K. Komori, H. H. Yeoh, and N. Oyama (2000) Disposable test plates with tyrosinase and beta-glucosidases for cyanide and cyanogenic glycosides. *Anal. Chim. Acta.* 408: 233-240.
51. Saratale, R. G., G. D. Saratale, J. S. Chang, and S. P. Govindwar (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42: 138-157.
52. Duran, N. and E. Esposito (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Appl. Catal. B - Environ.* 28: 83-99.
53. Rosenzweig, A. C. and M. H. Sazinsky (2006) Structural insights into dioxygen-activating copper enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 729-735.
54. Ismaya, W. T., H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, and B. W. Bijkstra (2011) Crystal structure of agaricus bisporus mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50: 5477-5486.