

호냉성 균주 유래 재조합 티로시나아제 효소, tyrosinase-CNK의 반응 안정성 연구

최유래, 도현수, 정다원, 박준태, 최유성*

충남대학교 공과대학 응용화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99

(2016년 8월 1일 접수; 2016년 8월 22일 수정본 접수; 2016년 8월 22일 채택)

Reaction Stability of the Recombinant Tyrosinase-CNK Originating from the Psychrophilic Marine Microorganism *Candidatus Nitrosopumilus Koreensis*

Yoo Rae Choi, Hyunsu Do, Dawon Jeong, Junetae Park, and Yoo Seong Choi*

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University
99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

(Received for review August 1, 2016; Revision received August 22, 2016; Accepted August 22, 2016)

요 약

본 연구에서는, 저온 및 약산성 조건에서 높은 활성을 보이는 티로시나아제인 tyrosinase-CNK의 반응 안정성을 조사하였다. Tyrosinase-CNK는 지금까지 알려진 중온성(mesophilic) 및 호열성(thermophilic) 환경 유래의 티로시나아제 보다는 열 안정성이 낮았으나 0 °C에서 효소 안정성이 매우 뛰어났고, 반복적인 동결-해동(freeze-thaw) 과정에서도 효소 활성을 안정적으로 유지하였다. 또한, 물과 ethanol 및 acetonitrile이 혼합된 유기용매 환경에서 초기 상대 활성 값의 변화가 관찰되었으나 유기용매 농도의 증가로 인한 추가적인 활성 저하를 유발하지 않고 활성을 일정하게 유지하였다. 한편, 효소 반응의 염(salt)에 대한 저해는 chaotropic 특성이 많이 나타나는 염일수록 적게 나타났다. 결과적으로, tyrosinase-CNK는 통상의 티로시나아제를 이용하여 반응을 수행하기 어려운 환경에서도 원하지 않는 반응을 억제하고 효소 불활성화를 최소화하면서 반응을 촉매할 것으로 기대된다.

주제어 : 티로시나아제, 반응 안정성, 호냉성 효소, 티로신, 도파

Abstract : Tyrosinases catalyze the hydroxylation of a monophenol (monophenolase activity) and the conversion of an o-diphenol to o-quinone (diphenolase activity), which are mainly involved in the modification of tyrosine residues into 3,4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA) and DOPA/DOPAquinone-derived intermolecular cross-linking. Previously, we obtained a slightly acidic and cold-active tyrosinase, tyrosinase-CNK, by our recombinant protein approach. The enzyme showed optimal activity at pH 6.0 and 20 °C with an abnormally high monophenolase/diphenolase activity ratio and still had approximately 50% activity compared with the highest activity even in ice water. Here, we investigated reaction stability of the recombinant tyrosinase-CNK as a psychrophilic enzyme. The enzyme showed remarkable thermal stability at 0 °C and the activity was well conserved in repeated freeze-thaw cycles. Although water-miscible organic solvent as reaction media caused the activity decrease of tyrosinase-CNK as expected, the enzyme activity was not additionally decreased with increased concentration in organic solvents such as ethanol and acetonitrile. Also, the enzyme showed high salt tolerance in chaotropic salts. It was remarkably considered that 2⁺ metal ions might inhibit the incorporation of Cu²⁺ into the active site. We expect that these results could be used to design tyrosinase-mediated enzymatic reaction at low temperature for the production of catechols through minimizing unwanted self-oxidation and enzyme inactivation.

Keywords : Tyrosinase, Reaction stability, Psychrophilic enzyme, Tyrosine, L-DOPA

* To whom correspondence should be addressed. (Yoo Rae Choi and Hyunsu Do are contributed equally to this work.)

E-mail: biochoi@cnu.ac.kr; Tel: +82-42-821-5682; Fax: +82-42-822-8995

doi: 10.7464/ksct.2016.22.3.175 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

효소는 생물유래의 친환경 촉매로써, 뛰어난 기질특이성, 저온에서의 높은 활성 및 환경친화적 특성을 지니고 있어, 화학 촉매를 이용한 공정에서 아직까지 해결하지 못한 반응의 잠재적 해결방법으로 제시되거나, 저온저압 및 환경친화적인 공정이 필요한 반응에 활용될 가능성이 높다. 하지만, 단백질이 주성분으로 구성된 효소는 대체로 반응이 수계 시스템에 최적화되어 진행되고, 다양한 반응공정에서 효소의 안정성이 낮으며 생산 비용이 높아, 아직까지 효소를 산업적으로 적극 활용하는데 제한이 따르고 있다. 따라서, 내재적으로 안정한 효소를 탐색 및 설계를 통해 확보하거나, 유전자재조합 및 돌연변이체 개발에 의한 효소 안정화 전략을 개발하고 있으며, 효소 고정화 및 화학적 표면 개량에 기초한 안정성 향상 등 다양한 방법들이 연구되고 있다[1,2]. 또한, 이를 위하여 대량 생산이 가능하면서 동시에 활용가능성이 높은 효소를 우선 확보하고, 다양한 온도, pH 및 염(salt) 등의 반응 조건에서 확보한 효소의 반응 안정성에 대한 이해가 무엇보다 필요하다.

티로시나아제(tyrosinase)는 멜라닌(melanin) 색소의 생합성에 관여하는 핵심 효소로, 리그닌의 생물학적 분해를 위한 라카아제(laccase) 및 무척추동물의 산소 운반체로 활용되는 헤모시아닌(hemocyanin)과 비슷하게 분류되는 type-3 구리(Cu) 효소(monophenol monooxygenase, EC. 1.14.18.1)이다[3]. 티로시나아제는 기본적으로 생물체 내에서 L-tyrosine (L-Tyr)을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 전환하고(monophenolase activity), L-DOPA를 Dopaquinone으로 변환시키며(diphenolase activity), 뿐만 아니라 다양한 형태의 monophenolic 또는 diphenolic 화합물을 반응 기질로 사용하여 catechol 및 quinone으로 전환하는 반응을 촉매한다[4,5]. 따라서, 페놀을 함유하는 chlorophenol, fluorophenol, p-cresol, azo dye 등의 폐수나 오염물질의 정화, pico 몰 이하 농도의 mono-, diphenolic 방향족 화합물의 검출 및 정량 분석과 더불어, 의약품, 플라스틱, 향산화제, 농화학물질의 합성에 필요한 핵심 중간체인 여러 형태의 L-DOPA를 포함하는 catechol 합성에 이용될 수 있다[6,7]. 지금까지 다양한 생명체에서 티로시나아제의 유전자 서열이 알려졌음에도 불구하고, 정제된 티로시나아제의 생화학적 특성에 대한 정보는 상대적으로 많이 알려져 있지 않다. 그리고, 일부 100 °C 이상의 매우 높은 온도에서 활성을 띄거나[8], 유기용매에서 활성이 더 좋은 사례가 보고되고 있으나[9], 대체적으로 알려진 박테리아 유래의 티로시나아제는 분자량이 20~60 kDa이고, 수용액 상에서 넓은 pH 및 온도 영역에서 활성을 띄고 있으며, 약 7.5의 최적 pH와 40 °C에서 반응 최적 온도를 갖고 있다[7]. 하지만, 중성 및 염기성 pH와 고온에서 티로시나아제의 반응 생성물인 L-DOPA와 같은 catechol 생성물은 원하지 않는 자연적인 산화에 의해 변형되기 쉬워[10], 한편으로 낮은 온도와 산성 영역에서 최적의 활성을 갖고 대량생산이 가능한 티로시나아제의 확보가 요구되고 있다.

본 연구팀은 최근 해양 극지인 북극권의 Svalbard에 있는

해양 퇴적물에서 발견된 고세균에 존재하는 티로시나아제인 tyrosinase-CNK의 유전자 서열을 재조합하여 대장균에서 대량발현에 성공하였다[11]. 확보된 Tyrosinase-CNK는 pH 6.0의 약산성 조건과 20 °C 상온에서 최적 활성을 나타내었고, 특히적으로 0 °C에서도 최적 활성의 50% 정도의 높은 활성을 갖고 있고, 다른 티로시나아제와 달리 높은 monophenolase/diphenolase 활성비를 보여 산업적 활용 가능성이 높을 것으로 판단되었다. 이러한 측면에서, 본 연구에서는 tyrosinase-CNK의 산업적 활용 가능성을 더욱 타진하기 위하여, tyrosinase-CNK의 반응 안정성을 다양한 온도, 유기용매, 염 조건에서 분석하였다. 또한, tyrosinase-CNK 수용액의 동결/해동 시 활성 저하 정도를 확인하였다.

2. 실험

2.1. Tyrosinase-CNK 발현 및 정제

Tyrosinase-CNK를 발현하기 위한 조건은 이전의 논문에서 발표된 실험과정을 바탕으로 다음과 같이 진행하였다[11]. pTYR-CNK 벡터와 샤페론(chaperone) 단백질 발현을 위한 pGro7 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 동시에 도입하였다. Tyrosinase-CNK 발현을 위하여, 우선 50 µg mL⁻¹의 ampicillin과 34 µg mL⁻¹의 chloramphenicol 및 0.5 mg mL⁻¹ L-arabinose가 포함된 LB 배지에 상기 벡터가 포함된 BL21 (DE3) 대장균 세포를 접종하여, 37 °C에서 진탕배양하였다. 그리고 단백질 발현을 유도하기 위하여 흡광도(OD₆₀₀)값이 0.8~1.0 정도 되었을 때, 단백질 발현 유도물질인 Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.1 mM 되도록 첨가하였고, 20 °C에서 20시간 동안 추가로 배양한 후, 배양된 세포를 원심 분리하여 상등액을 제거하고 세포를 회수하였다. 회수된 세포를 세포 파쇄를 위한 용액(50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 부유시킨 다음 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 상기 단백질의 수용성 분액을 니켈 레진이 충전된 컬럼에 적용하여 단백질과 컬럼이 결합하도록 하고, 세척용액(50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)로 컬럼에 결합하지 않은 단백질을 우선적으로 씻어 냈고, 마지막으로 컬럼 안의 레진이 차지하는 부피만큼의 단백질 용출을 위한 용액(50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 단백질 용출하여 tyrosinase-CNK 효소를 회수하였다.

2.2. Tyrosinase-CNK의 열 안정성 및 반복적인 동결-해동 (freeze-thaw)

Tyrosinase-CNK의 열 안정성을 알아보기 위하여 0 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C의 일정한 온도에 정제된 Tyrosinase-CNK 용액을 넣어 두었고, 30분마다 샘플을 취하는 방식으로 150 분 동안, L-DOPA를 기질로 하여, 96-well plate에서 총 부피 200 µL에, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA, 0.4 µM tyrosinase-CNK가 되도록

하여 남아있는 효소의 활성을 분석하였다. 효소의 활성은, 반응을 통해 생성되는 L-dopachrome의 양을, 분광광도계를 이용하여 475 nm에서의 흡광도를 10초 간격으로 측정하여, 반응 초기 기울기의 변화를 통해 비교하였다. 한편, 반복적인 동결-해동(freeze-thaw) 과정에서 효소의 활성 변화를 측정하기 위하여, 준비된 효소 샘플을 -70 °C deep freezer에서 20분 동안 급속 냉동시킨 뒤 다시 25 °C 상온으로 꺼내어 해동하는 과정을 반복하였고, 효소의 활성은 총 부피 200 µL에 최종 농도가 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA, 0.4 µM tyrosinase-CNK가 되도록 하여 마찬가지로 남아있는 효소의 활성을 분석하였다.

2.3. Tyrosinase-CNK의 유기용매 안정성

Tyrosinase-CNK의 유기용매 안정성을 알아보기 위하여, 모델 용매로 ethanol, acetonitrile, N,N-dimethylformamide (DMF), tetrahydrofuran (THF)의 4가지 유기용매를 사용하였다. 유기용매 안정성 측정 실험을 진행하기에 앞서 buffer에 녹아 있는 효소 샘플을 최종 농도가 10%, 30%, 50%, 70%, 90%가 되도록 유기용매를 첨가하고, 30분 동안 얼음물(0 °C)에 보관하였다. 남아 있는 효소 활성은 총 부피 1 mL에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA, 0.4 µM tyrosinase-CNK가 되도록 하여 분석하였다.

2.4. Tyrosinase-CNK의 염(salt) 안정성

Tyrosinase-CNK의 염(salt) 안정성을 알아보기 위하여, 2가 양이온을 가진 염으로 CaCl₂와 MgCl₂를, 1가 양이온을 가진 염으로 NH₄Cl, KCl, NaCl, LiCl을 tyrosinase-CNK의 염 안정성 측정하는 모델을 삼았다. 염에 대한 안정성을 측정하기에 앞서 모든 염, buffer와 효소는 얼음물(0 °C)에 넣어 최대한 낮은 온도를 유지하였다. 효소의 활성은 추가하는 염의 최종 농도가 각 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M, 1.25 M 일 때, 총 부피 200 µl에 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), 0.01 mM CuSO₄, 0.05 mM L-DOPA, 0.4 µM tyrosinase-CNK가 되도록 하여 분석하였다. 효소의 염에 대한 상대 활성은, 상기의 효소를 반응하는 buffer에 추가적인 염을 넣지 않았을 때의 효소 활성을 1로 기준으로 하여, 염이 추가되었을 때의 활성 변화로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tyrosinase-CNK의 열 안정성 및 해동(freeze-thaw) 안정성

Figure 1을 보면 알 수 있듯이, tyrosinase-CNK의 열 안정성은 다른 호냉성(psychrophilic) 효소들에서와 마찬가지로 중온성(mesophilic) 및 호열성(thermophilic) 효소들과 비교하여 낮게 나타났다. 이전의 연구에서 20 °C에서 최적의 효소활성을 보였으나[11], 20 °C에 보관하는 시간이 점차 늘어남에 따라 효소의 활성이 서서히 감소하였고, 효소를 보관하는 온도

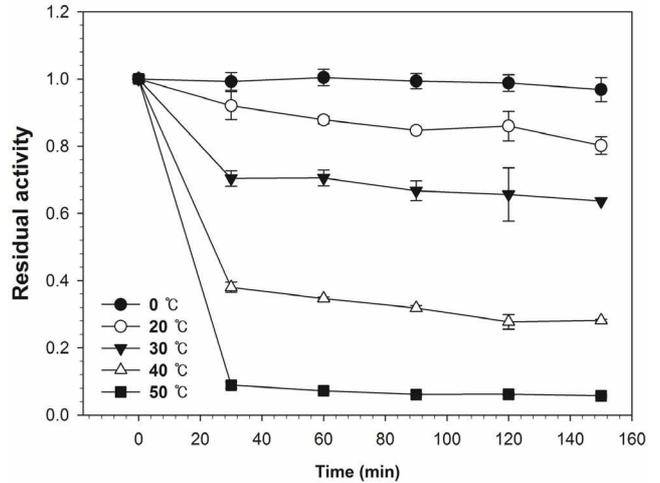


Figure 1. Thermostability of tyrosinase-CNK at various temperatures.

가 올라감에 따라 효소 활성의 저하 정도는 점차 심해졌다. 하지만, 0 °C 얼음물에 보관한 효소의 경우 안정적으로 초기 활성이 유지되었고, 이전 결과에서 0 °C에서도 20 °C 활성의 50% 정도를 갖고 있어, tyrosinase-CNK는 저온효소반응 공정에 매우 적절한 것으로 판단되었다. 한편, tyrosinase-CNK 수용액을 얼렸다 녹이는 동결-해동과정(freeze-thaw)을 반복 수행했을 때 효소의 활성 변화를 확인하였다. Figure 2에서 보듯이 tyrosinase-CNK는 저온에 최적화된 효소답게 해동과정의 횟수를 늘려도 초기 효소 활성을 어느 정도 안정적으로 유지하고 있음을 확인하였다. 일반적으로 동결-해동과정은 효소의 활성 저하에 영향을 주는 것으로 알려져 있고, 상업적으로 효소 및 단백질의 안정성을 유지하기 위하여 동결방지제 및 안정화제가 사용되고 있음을 감안할 때[12], 본 연구로부터 얻어진 저온에서 뛰어난 안정성을 나타내는 tyrosinase-CNK는 효소축매 반응 시 높은 온도에서 원하지 않는 화학 반응을

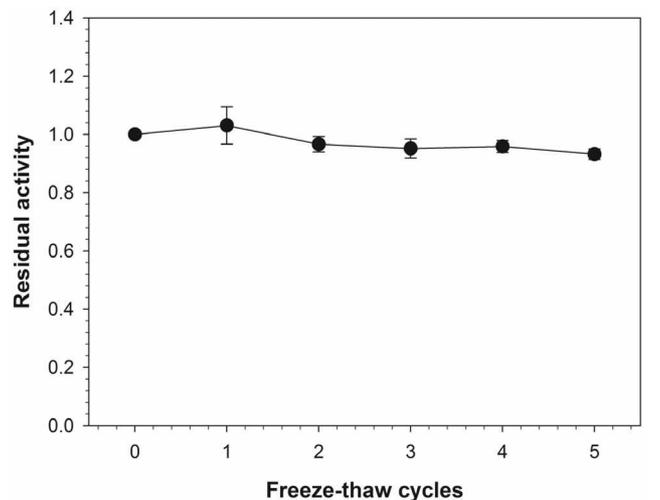


Figure 2. Effect of multiple freeze-thaw cycles on the activity of tyrosinase-CNK.

최소화할 수 있고, 반응 이후 고온 처리에 의해 빠르게 효소를 불활성화 시킬 수 있을 것이다.

3.2. Tyrosinase-CNK의 유기용매 안정성

유기용매 효소반응에서 물과 혼화될 수 없는 용매(water-immiscible solvent)의 경우, 비수계 효소반응을 수행할 때 용매가 효소 활성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있어[13], 효소의 비활성화에 많은 영향을 끼치는 물과 혼화될 수 없는 용매(water-immiscible solvent) 시스템에서의 tyrosinase-CNK의 유기용매 안정성을 분석하였다. 실험에 사용하는 물과 혼화될 수 없는 용매(water-immiscible solvent)는 다른 효소들에 대하여 상대적으로 효소의 활성에 크게 영향을 주지 않는 것으로 알려진 ethanol과 효소의 활성 저하가 빨리 이루어지는 THF [13,14], 그리고 많이 사용되는 대표적 용매인 acetonitrile과 DMF를 모델로 선정하였다. 그리고 수용액에서의 효소의 활성과, 다양한 모델 유기용매 농도에서 30분간 효소를 넣어 둔 다음 남아있는 효소 활성을 측정하였다. Figure 3에서 보듯이, 전체적으로 효소의 활성은 유기용매의 농도가 증가함에 따라 활성의 감소 정도가 점차 증가하는 경향을 나타내고 있다. 특징적으로 ethanol의 경우는 용매가 첨가됨에 따라 효소의 활성이 수용액 대비 약 80% 정도로 감소하였으나, ethanol 농도가 증가하더라도 추가적인 효소 활성의 저하는 측정되지 않았다. 또한, acetonitrile의 경우, 용매 농도 증가에 의해 효소의 활성이 수용액 대비 약 55% 정도까지 감소하였으나, 그 이상의 용매 농도에서는 ethanol과 마찬가지로 효소의 활성이 일정하게 유지되었다. 반면, DMF와 THF의 경우는 용매의 농도가 증가함에 따라 효소의 활성이 계속 감소하여 70% 이상의 용매 농도에서는 효소의 활성이 거의 나타나지 않았다. 위의 용매들과 효소 간의 아미노산-아미노산, 아미노산-물과의 상호작용으로 인해 효소의 unfolding에 관여하여 효소의 구조적 비활성화를 야기하고, 다른 효소들과 마찬가지로 용매에 의한 효소의 구조적 변화의 관여 정도에 따라 비활성화가 진행

되는 것으로 보인다[15,16]. 흥미로운 점은 tyrosinase-CNK의 경우 ethanol, acetonitrile과 같은 용매에서는 이들에 의해 상대적으로 일정 수준의 활성이 저하된 이후 일정하게 활성이 유지되고 있어, 이들 유기용매 시스템에서 tyrosinase-CNK 효소를 이용한 반응을 적용할 가능성이 보이고, 결과적으로 수용액 효소반응에서의 낮은 기질 또는 생성물 용해도 문제를 극복할 잠재성이 기대된다.

3.3. Tyrosinase-CNK의 염(salt) 안정성

촉매활성을 보이기 위해 활성부위에 Cu가 요구되는 tyrosinase-CNK는 반응 시 buffer 용액에 Cu 이온을 넣어주지 않으면 활성을 나타내지 않았다. 티로시나아제의 활성부위를 보면, 통상적으로 두 개의 Cu 이온 각각 주위에 존재하는 세 개의 히스티딘(histidine) 잔기와 상호작용하여 구리결합부위(copper binding site)를 형성하고 이를 안정적으로 구조를 유지하는 것으로 알려져 있다[17]. 하지만, tyrosinase-CNK는 촉매반응 시 buffer 용액에 Cu 이온이 존재하지 않을 경우 활성을 나타내지 않아, 구리결합부위에서 Cu가 결합하여 안정적으로 유지되지 않고, 가역적으로 활성부위에 약하게 결합하는 것으로 추정되었다. 이러한 측면에서, Cu와 마찬가지로 2가 양이온이면서 해양환경에 많이 존재하는 Ca와 Mg이온이 활성부위에 Cu이온의 결합을 저해하여 활성을 떨어뜨리는지를 확인하였다. Figure 4에서 보면 알 수 있듯이, CaCl₂ 및 MgCl₂가 존재할 때 효소 활성 저하가 관찰되었고, CaCl₂ 및 MgCl₂ 농도가 증가할수록 그리고 Cu와 더 비슷한 수준의 원자 반경과 이온화에너지 값을 갖는 Mg 이온에서 저해 정도가 더 높게 나타났다. 한편, 단백질과 염의 상호작용 정도에 따른 척도로서 Hofmeister series를 바탕으로 1가 양이온들을 선별하여 효소의 활성에 영향을 주는 정도를 알아보았다. 통상적으로 Hofmeister series에 기반한 단백질과 염의 상호작용 정도는 양이온보다 음이온에서 더 차이가 크게 나타나지만[18,19], 본 연구에서는 활성부위에 양이온이 중요한 역할을 하므로 다양한 양이온 염에 대한 영향을 알아보는데 집중하였다.

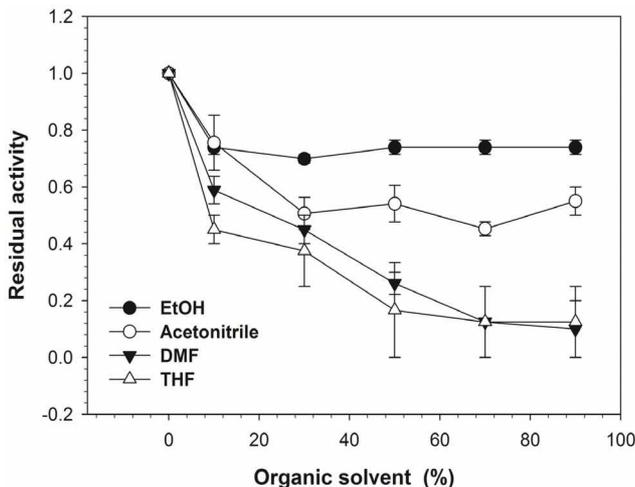


Figure 3. Effect of various organic solvents on the activity of tyrosinase-CNK.

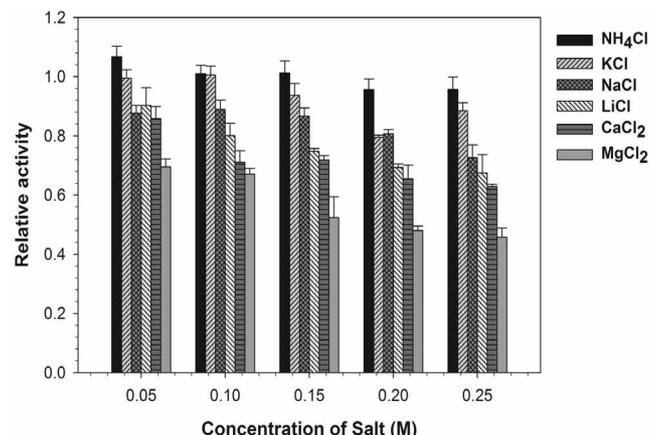


Figure 4. Effect of various salts on the activity of tyrosinase-CNK.

Hofmeister series에 따르면 $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ 순서로 단백질의 변성 정도가 작고 안정성이 증가하는 경향을 보이는 것으로 보고되고 있고[18,19], Tyrosinase-CNK에서도 마찬가지로 상기 순서에 따라 염의 농도에 대한 단백질의 활성 저하 정도가 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 0.05 M NH_4Cl 을 추가로 반응 buffer에 넣었을 경우, 그렇지 않은 경우보다 오히려 활성이 더 높아지는 결과를 특징적으로 관찰되었는데, 이는 추가된 저농도의 양이온이 단백질의 활성부위에서 오히려 반응에 긍정적인 영향을 미친 것으로 여겨지며, 이러한 결과는 이전의 다른 효소에서도 보고된 바 있다 [20]. 즉, tyrosinase-CNK의 반응 활성과 안정성을 더 좋게 유지하기 위하여 반응용액에 사용하는 염은 Cu 이외의 2가 양이온은 피하면서 카오트로픽(chaotropic) 염이 적절할 것으로 판단되었다.

4. 결론

호냉성 균주 유래의 재조합 티로시나아제인 tyrosinase-CNK의 반응 안정성에 대하여 조사하였다. 0 °C에서도 높은 활성을 보이는 tyrosinase-CNK는 고온에서의 열 안정성은 우수하지 않았으나, 저온에서 뛰어난 안정성을 보였고 동결과 해동을 반복하여도 효소의 활성이 잘 유지되었다. 또한, ethanol 및 acetonitrile과 같은 유기용매에서 초기 활성이 유기용매 첨가에 의해 낮아지기는 하였으나, 유기용매 농도를 증가시켜도 co-solvent 내에서의 효소 활성이 안정적으로 유지되었다. 한편, 염 안정성 측면에서 카오트로픽(chaotropic) 특성이 많이 나타나는 염에 대하여 안정성이 좋게 나타남을 확인하였다. 저온 및 약산성(pH 6.0)에서의 뛰어난 활성과 안정성을 보이는 tyrosinase-CNK는, 원하지 않는 산화반응을 억제하면서 L-DOPA와 같은 카테콜(catechol)을 생산하는 데 효율적으로 적용될 것이고, 저온 및 친환경 조건에서 다양한 바이오 소재의 생산에 활용될 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 2016년도 충남대학교 CNU 학술연구비 연구과제의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

References

- Burton, S. G., Cowan, D. A., and Woodly, J. M., "The Search for the Ideal Biocatalyst," *Nat. Biotech.*, **20**(1), 37-45 (2002).
- Iyer, P. V., and Ananthanarayan, L., "Enzyme Stability and Stabilization - Aqueous and Non-aqueous Environment," *Process Biochem.*, **43**(10), 1019-1032 (2008).
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E., "Multicopper Oxidases and Oxygenases," *Chem. Rev.*, **96**(7), 2563-2605 (1996).

- Fairhead, M., and Thony-Meyer, L., "Bacterial Tyrosinases: Old Enzymes with New Relevance to Biotechnology," *New Biotech.*, **29**(2), 183-191 (2012).
- Ramsden, C. A., and Riley, P. A., "Tyrosinase: The Four Oxidation States of the Active Site and Their Relevance to Enzymatic Activation, Oxidation and Inactivation," *Bioorgan. Med. Chem.*, **22**(8), 2388-2395 (2014).
- Duran, N., and Esposito, E., "Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review," *Appl. Catal. B-Environ.*, **28**(2), 83-99 (2000).
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M., and Thony-Meyer L., "Bacterial Tyrosinases and Their Applications," *Process Biochem.*, **47**(12), 1749-1760 (2012).
- Kong, K. H., Hong, M. P., Choi, S. S., Kim, Y. T., and Cho, S. H., "Purification and Characterization of a Highly Stable Tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31**, 113-118 (2000).
- Shuster, V., and Fishman A., "Isolation, Cloning and Characterization of a Tyrosinase with Improved Activity in Organic Solvents from *Bacillus megaterium*," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **17**(4), 188-200 (2009).
- Anderson, T. H., Yu, J., Estrada, A., Hammer, M. U., Waite, J. H., and Israelachvili, J. N., "The Contribution of DOPA to Substrate-Peptide Adhesion and Internal Cohesion of Mussel-Inspired Synthetic Peptide Films," *Adv. Funct. Mater.*, **20**(23), 4196-4205 (2010).
- Kim, H., Yeon, Y. J., Choi, Y. R., Song, W., Pack, S. P., and Choi, Y. S., "A Cold-Adapted Tyrosinase with an Abnormally High Monophenolase/Diphenolase Activity Ratio Originating from the Marine Archaeon *Candidatus Nitrosopumilus koreensis*," *Biotechnol. Lett.*, in press (2016).
- Cao, E. H., Chen, Y. H., Cui, Z. F., and Foster, P. R., "Effect of Freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions," *Biotechnol. Bioeng.*, **82**(6), 684-690 (2003).
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., and Veeger, C., "Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents," *Biotechnol. Bioeng.*, **102**(1), 2-8 (2009).
- Mozhaev, V. V., "Engineering stability of enzymes in systems with organic solvents," in Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., and Halling, P. J., Eds., *Stability and Stabilization of Biocatalysis*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp. 355-364 (1998).
- Fagain, C., "Understanding and Increasing Protein Stability," *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.*, **1252**(1), 1-14 (1995).
- Szabo, A., Kotorman, M., Laczko, I., and Simon, L. M., "Spectroscopic Studies of Stability of Papain in Aqueous Organic Solvents," *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **41**(1-2), 43-48 (2006).

17. Kanteev, M., Goldfeder, M., and Fishman, A., "Structure-Function Correlations in Tyrosinases," *Protein Sci.*, **24**(9), 1360-1369 (2015).
18. Yang, Z., "Hofmeister Effects: an Explanation for the Impact of Ionic Liquids on Biocatalysis," *J. Biotechnol.*, **144**(1), 12-22 (2009).
19. Zhang, Y. J., and Cremer, P. S., "Interactions Between Macromolecules and Ions: the Hofmeister Series," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **10**(6), 658-663 (2006).
20. Toth, K., Sedlak, E., Sprinzl, M., and Zoldak, G., "Flexibility and Enzyme Activity of NADH Oxidase from *Thermus thermophilus* in the Presence of Monovalent Cations of Hofmeister Series," *BBA-Proteins Proteom.*, **1784**(5), 789-795 (2008).