



pH-dependence in the inhibitory effects of Zn²⁺ and Ni²⁺ on tolaasin-induced hemolytic activity

Yeong-Bae Yun¹ · Tae-Keun Choi¹ · Young-Kee Kim¹

Zn²⁺와 Ni²⁺에 의한 톨라신 용혈활성 저해효과의 pH 의존성

윤영배¹ · 최태근¹ · 김영기¹

Received: 29 May 2018 / Accepted: 11 June 2018 / Published Online: 30 September 2018
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

Abstract Tolaasin secreted by *Pseudomonas tolaasii* is a peptide toxin and causes brown blotch disease on the cultivated mushrooms by collapsing cellular and fruiting body structure. Toxicity of tolaasin was evaluated by measuring hemolytic activity because tolaasin molecules form membrane pores on the red blood cells and destroy cell membrane structure. In the previous studies, we found that tolaasin cytotoxicity was suppressed by Zn²⁺ and Ni²⁺. Ni²⁺ inhibited the tolaasin-induced hemolysis in a dose-dependent manner and its K_i value was 1.8 mM. The hemolytic activity was completely inhibited at the concentration higher than 10 mM. The inhibitory effect of Zn²⁺ on tolaasin-induced hemolysis was increased in alkaline pH, while that of Ni²⁺ was not much dependent on pH. When the pH of buffer solution was increased from pH 7 to pH 9, the time for 50% hemolysis (T₅₀) was increased greatly by 100 μM Zn²⁺; however, it was slightly increased by 1 mM Ni²⁺ at all pH values. When the synergistic effect of Zn²⁺ and Ni²⁺ on tolaasin-induced hemolysis was measured, it was not dependent on the pH of buffer solution. Molecular elucidation of the difference in pH-dependence of these two metal ions may contribute to understand the mechanism of tolaasin pore formation and cytotoxicity.

Keywords Hemolysis · Metal ions · Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) · Peptide toxin · Synergistic effect

서론

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 인공재배에 의해 주로 생산되며, 가장 높은 소득을 보장하는 작물중의 하나로, 최근 성인병과 관련한 다양한 효능이 보고되어 건강식품으로서의 가치가 높다[1]. 또한, 버섯이 갖고 있는 항산화 물질은 높은 활력을 보여 DNA 손상과 암을 일으키는 자유라디칼의 생성을 감소시켜 신체를 보호하는 역할을 한다[2]. 그럼에도 불구하고 최근 느타리버섯의 재배면적은 점차 감소하고 있으며, 이것의 주요 원인은 세균성 갈반병의 잦은 발병이다[3]. 갈반병은 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하는 세균병으로 수분함량이 높고 부드러운 조직을 가진 모든 버섯에서 나타난다[4]. 갈반병의 보고는 1915년 Tolaas에 의해 이루어졌으며[5], 느타리버섯뿐만 아니라 양송이버섯(*Agaricus bisporus*) 및 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 등에도 심각한 피해를 주고 있어, 유럽을 비롯한 여러 국가에서 양송이버섯 재배를 대상으로 많은 연구가 이루어져 왔다[6].

갈반병의 발생은 주로 버섯 자실체 형성 초기에 *P. tolaasii*가 감염되어 나타난다. 일단 병이 발생하면 어린 버섯의 경우 조직 전체가 괴사하여 녹아 내리며, 성장한 버섯에는 갓 조직에 갈색반점을 형성하여 버섯 조직을 진한 갈색으로 변화시키고 악취를 발생시켜 상품성을 없앤다[7]. 갈반병은 발병의 예측이 어려우며, 병이 발생하면 재배상과 재배단지 전체에 빠르게 번져 수확이 불가능하게 된다[4]. 국내에서 갈반병에 대한 연구는 피해 규모와는 달리 상대적으로 미흡한 수준이다. 다만, 병원균의 분리 및 동정, 특성연구에서 느타리버섯과 팽이버섯을 대상으로 갈반병을 일으킬 수 있는 세균을 흰색침강선형성검정법(white

Young-Kee Kim (✉)
E-mail: ykkim10@cbnu.ac.kr

¹Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Republic of Korea

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.

line test)과 버섯조직함몰검정법(pitting test) 등으로 *P. tolaasii*와 *P. agarici*를 분리하였으며, *P. tolaasii*가 갈반병의 원인균임을 확인하였다[4,6]. 이 균주가 분비하는 톨라신은 버섯 세포막을 파괴하여 갈반병의 직접적인 원인인 것으로 확인되었다[8]. 톨라신의 버섯 세포막 파괴에 대한 명확한 기작은 자세히 밝혀지지 않았으나, 톨라신 펩티드의 세포막 결합 및 유입, 막에서의 다중화결합을 통한 pore 형성, 형성된 pore를 통한 용질의 이동으로 삼투압 교란을 일으켜 버섯 세포의 파괴가 일어나는 것으로 확인되고 있다[9].

톨라신은 antimicrobial peptide의 일종으로, 이 펩티드의 독성 평가에는 양송이버섯을 이용한 버섯조직함몰검정법(pitting test)이 알려져 있으나[10], 이 방법은 관측 시간이 오래 걸리고 독성의 정량적 평가가 어렵다. 반면, 적혈구를 이용한 용혈활성검정법(hemolysis)은 측정 시간이 빠르며, 독성의 정량 및 정성 평가에 용이하다[11]. 본 연구에서는 용혈활성검정법을 이용하여 다양한 금속이온의 톨라신 용혈활성 저해 특성을 조사하던 중 기존에 저해효과가 알려진 Zn^{2+} 에 더하여 Ni^{2+} 이 톨라신의 세포독성을 저해함을 발견하고[12], pH 변화에 따른 Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 작용특성을 조사하였으며, 두 이온을 함께 처리하였을 때의 세포독성 저해 효과 상승작용을 확인하였다.

재료 및 방법

톨라신의 분리 및 정제

P. tolaasii 6264 균주를 PAF 액체배지에 접종한 후, 25 °C에서 18시간 이상 정제기에 도달하도록 진탕배양하였다. 균주 배양액을 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 세균을 제거한 후, 배양여액을 취하여 30%의 ammonium sulfate를 가하고, 4 °C에서 1시간 동안 정지하였다. 이 후에 SW28 rotor (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 20,000 rpm에서 1시간 동안 초원심분리하여 침전을 분리하였다. 원심분리로 침전시킨 톨라신을 완충액으로 재현탁하고 실온에서 4시간 동안 투석하여 glass-teflon으로 균질화한 후 분액으로 만들어 -80 °C에서 보관하며 사용하였다.

톨라신의 용혈활성 측정

톨라신의 용혈활성은 쥐의 적혈구를 이용하여 측정하였다. 용혈활성 측정에 사용한 적혈구는 HBS 완충액으로 10배 희석한 후 반응용액에 1%가 되도록 첨가하였다[11]. 37 °C에서 1% 적혈구액을 30분 이내에 모두 용혈시키는 톨라신의 농도를 1 HU (Hemolytic unit)로 정하여 사용하였다. 용혈활성은 UV/Vis 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도의 감소를 측정하여 결정하였다. pH 변화에 따른 활성변화를 측정하기 위하여 사용한 pH 6과 7 완충액은 10 mM HEPES 완충액에 생리식염수(150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) 성분을 가하여 만들었고, pH 8과 9는 10 mM Tris 완충액으로 제조하였다. Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 농도에 따른 용혈활성은 기존의 톨라신 용혈활성 측정방법을 기본으로 하여 Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 을 HBS 완충액에 10% (v/v)가 되도록 첨가하여 측정하였다.

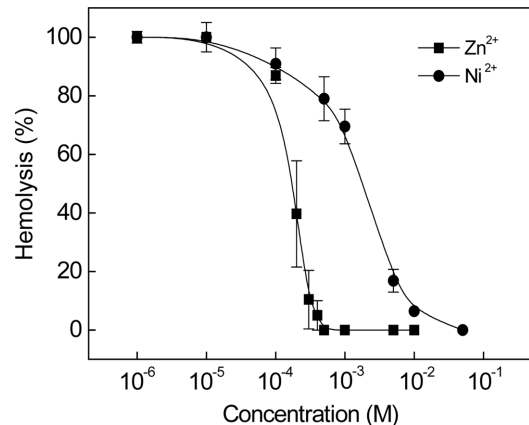


Fig. 1 Effects of Zn^{2+} and Ni^{2+} on the tolaasin-induced hemolysis. Dose responses of Zn^{2+} and Ni^{2+} on hemolysis were measured at various concentrations from 1 μ M and 50 mM

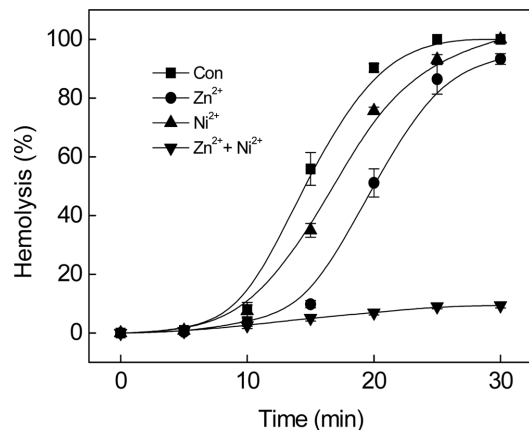


Fig. 2 Additive effect of Zn^{2+} and Ni^{2+} on the tolaasin-induced hemolysis. Effects of 100 μ M Zn^{2+} and 1 mM Ni^{2+} were measured at pH 7

결 과

Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 동시 첨가에 따른 상승효과

톨라신은 세포막에 pore를 형성하여 세포독성을 나타내며 Zn^{2+} 와 같은 2가 금속이온에 의해 가역적으로 저해됨이 보고되었다[13]. 적혈구를 이용한 용혈활성 측정에서 톨라신의 작용특성을 밝히기 위하여 2가 양이온인 Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 효과를 측정하였다. Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 톨라신 저해 농도를 조사하였을 때, Zn^{2+} 는 100 μ M 이상의 농도에서 용혈활성을 저해하기 시작하여 500 μ M 이상의 농도에서 용혈활성을 완전히 저해하였다. 그러나 Ni^{2+} 은 100 μ M 이상의 농도에서 저해하기 시작한 것은 Zn^{2+} 와 같으나, 10 mM 이상의 농도가 되어야 톨라신의 용혈활성을 완전히 저해하였다(Fig. 1). Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 의 K_i 값은 각각 170 μ M과 1.8 mM로 Zn^{2+} 보다 Ni^{2+} 이 농도기준으로 약 10배 낮은 저해 효과를 보였다.

용혈활성에 대한 금속이온의 저해효과를 조사하기 위하여 Zn^{2+} 와 Ni^{2+} 을 톨라신과 함께 적혈구에 처리하였다. 금속이온의 농

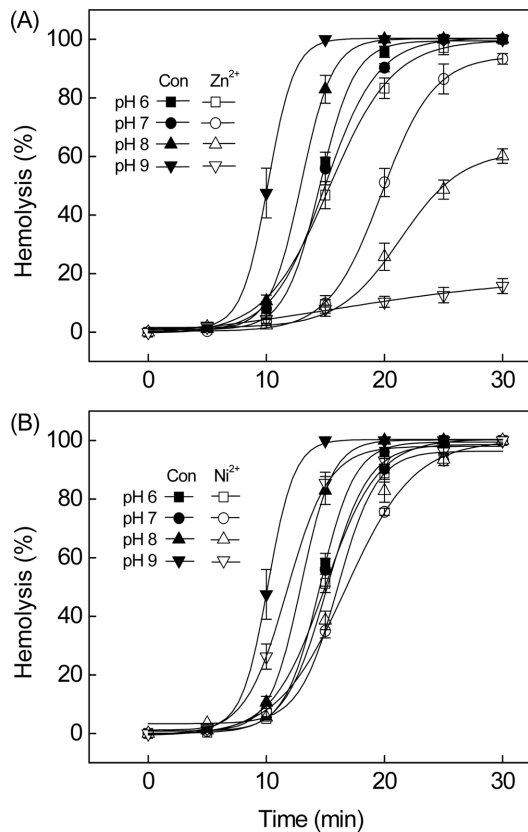


Fig. 3 pH-dependence of Zn²⁺ and Ni²⁺ effects on tolaasin-induced hemolysis. (A) Effects of 100 μM Zn²⁺ at various pH. (B) Effects of 1 mM Ni²⁺ at various pH

도는 톨라신의 활성을 20-30% 저해하는 농도로, Zn²⁺와 Ni²⁺을 각각 K_i 값보다 낮은 농도인 100 μM과 1 mM이 되도록 반응용액에 첨가하였다. 이러한 조건에서 Zn²⁺와 Ni²⁺은 20분 후에 톨라신의 용혈활성을 각각 50%와 25% 저해하였으나, 두 금속이온을 함께 처리하였을 경우에는 용혈활성이 약 90% 이상 저해되어 톨라신의 세포독성이 거의 완전히 저해되었다(Fig. 2). 각 저해실험에서 톨라신에 의해 용혈활성이 50% 일어나는 시간인 T₅₀을 비교해보면, 톨라신만을 처리한 대조구는 14.5분, Zn²⁺의 경우는 19.9분, Ni²⁺을 추가한 경우는 16.7분으로 대조실험 조건에 비하여 각각 5.4분과 2.2분의 시간이 지연되어 용혈작용이 이 두 금속이온에 의해 저해됨을 확인하였다. 그러나, 같은 농도의 Zn²⁺와 Ni²⁺을 동시에 첨가한 경우에는 시간이 경과하여도 적혈구의 용혈이 크게 증가하지 않아 T₅₀을 측정할 수 없었다. 이는 Zn²⁺와 Ni²⁺을 함께 처리하였을 때, 이들에 의한 톨라신 세포독성 억제효과가 크게 증가하는 상승작용이 있음을 보인다.

pH에 따른 Zn²⁺와 Ni²⁺의 톨라신 활성억제 효과

톨라신에 의한 용혈활성은 반응용액의 pH 변화에 따라 좌우된다. 용액의 pH가 증가할 때 톨라신의 세포독성이 커져 T₅₀이 15분에서 10분으로 감소함을 확인하였다[14]. 반응용액의 pH 변화에 따라 Zn²⁺와 Ni²⁺의 톨라신 저해 특성을 알아보기 위하여,

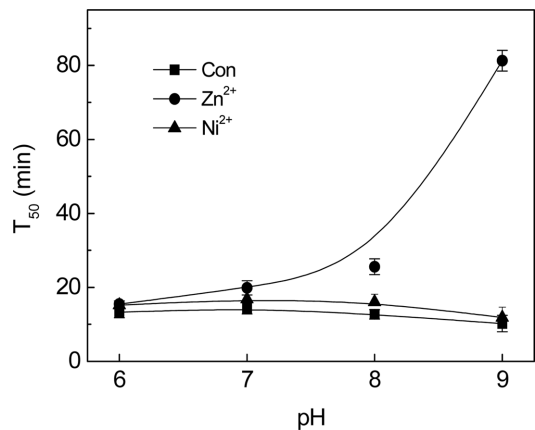


Fig. 4 T₅₀, time for 50% tolaasin-induced hemolysis, was measured at different pH values

pH별 반응용액을 만들어 Zn²⁺와 Ni²⁺을 첨가하고 용혈활성 변화를 측정하였다(Fig. 3). 먼저, 100 μM Zn²⁺를 처리한 경우에 pH 6에서는 대조실험에 비하여 톨라신의 용혈에 큰 변화가 없었다(Fig. 3A). pH 7에서는 Zn²⁺가 용혈작용을 지연시켰으나, 30분 이내에 용혈이 90% 이상 완료되었고 T₅₀은 약 5.5분 증가하여 톨라신의 독성이 저해되었다. 반면, 염기성인 pH 8과 9에서는 Zn²⁺에 의해 톨라신의 용혈활성이 각각 40%와 90%까지 크게 저해되었다. 한편, 1 mM Ni²⁺을 처리한 경우에는 대조구와 비교하여 톨라신 용혈활성의 저해가 10-15%로 작게 나타났으며 이러한 저해효과가 모든 pH에서 고르게 나타나 pH 변화에 의한 효과는 거의 관측되지 않았다(Fig. 3B).

pH 변화에 따른 Zn²⁺와 Ni²⁺의 톨라신 용혈활성 저해곡선에서 T₅₀을 측정하여 보면 같은 +2가 전이금속 이온이라도 Zn²⁺와 Ni²⁺의 톨라신 활성저해가 용액의 pH에 따라 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 4). 먼저, 1 mM Ni²⁺을 처리한 실험구에서는 대조구와 비교하여 T₅₀이 모든 pH에서 약 1.9-3.1분의 차이를 보이며 11.9-16.8분으로 측정되었다. 이것은 대조실험에 비하여 용혈활성이 약 10-15% 저해된 것으로, Ni²⁺의 효과는 pH 변화에 좌우되지 않음을 나타낸다. 그러나 Zn²⁺의 톨라신 용혈활성 저해효과는 알칼리 조건에서 크게 증가하였다. Zn²⁺를 첨가한 실험구에서는 pH 6과 pH 7에서는 T₅₀이 대조구와 큰 차이가 없었으나, pH가 증가할수록 Zn²⁺에 의한 저해정도가 크게 나타났고, 특히 pH 9에서는 T₅₀이 약 80분으로 증가하였다. 같은 전이금속의 2가 양이온임에도 톨라신의 세포독성 저해효과는 알칼리 조건에서 매우 큰 차이가 있었다.

pH 변화에 따른 Zn²⁺와 Ni²⁺의 상승효과

Zn²⁺와 Ni²⁺은 각각을 단독 처리하였을 때보다 동시에 처리하였을 때 톨라신의 용혈활성 억제 효과가 크게 증가하였다(Fig. 1). 또한, Zn²⁺는 알칼리 조건에서 용혈활성 억제 효과가 크게 나타남을 확인하였다(Fig. 4). Zn²⁺와 Ni²⁺의 동시 처리에 의한 상승효과와 용액의 pH 변화의 상관성 여부를 조사하였다. pH 6-9의 범위에서 100 μM Zn²⁺와 1 mM Ni²⁺을 동시에 처리하여 용혈활성을 측정하면서 20분 후에 용혈정도를 측정하였다.

앞에서의 결과와 마찬가지로 Zn²⁺만을 단독 처리한 경우에

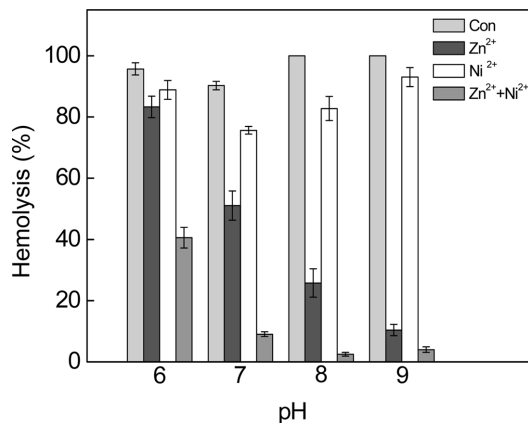


Fig. 5 Synergistic inhibitory effect of Zn²⁺ and Ni²⁺ on the tolaasin-induced hemolysis. Tolaasin-induced hemolysis was measured at the presence of both 100 μM Zn²⁺ and 1 mM Ni²⁺ at the indicated pH

용액의 pH가 증가함에 따라 톨라신의 용혈활성을 현저하게 저해되었다. Zn²⁺는 pH 6에서 20% 미만, pH 7에서는 약 50%의 용혈활성 저해효과를 보였으나, pH 8에서는 저해가 크게 증가하여 약 75%의 용혈활성을 저해하였으며, pH 9에서는 90% 이상 저해하였다(Fig. 5). 반면, Ni²⁺을 단독 처리한 경우에는 pH 6-9에서 약 5-25%를 저해하였으며 pH 7에서 가장 큰 저해효과를 보였다. 두 이온을 동시에 첨가하였을 때, 상승효과는 모든 pH에서 크게 관측되었다. pH 6과 7에서는 각각 이온의 단독 저해효과가 크지 않았음에도, 용혈활성 저해효과가 크게 증가하여 동시처리시에 상승효과가 관측되었다. 또한, pH 8과 9에서도 Zn²⁺와 Ni²⁺의 동시처리가 큰 저해효과를 보였으나, 알칼리 조건에서는 Zn²⁺의 단독처리 효과가 매우 크게 나타나 동시처리시에 얻어진 저해효과 상승작용도 주로 Zn²⁺에 의해 기여되는 것으로 판단된다.

고찰

본 연구실에서는 톨라신의 용혈활성을 저해하는 다양한 물질의 작용기작을 확인하였다. Zn²⁺는 펩티드성 pore-forming toxin의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 특히 톨라신 독소의 경우 세포막 결합보다는 세포막에 형성된 pore의 통로를 막아 세포독성을 저해한다고 보고하였다[13]. Tolaasin inhibitory factor로 불리는 지방산 에스터 화합물의 계면활성제는 톨라신과 같은 pore-forming 펩티드의 작용 과정 중 분자다중체 형성 단계를 저해함으로써 버섯 세포막에 pore 형성을 막아 갈반병 발생을 억제하는 것으로 밝혀졌다[15]. 또한, Ni²⁺에 의한 톨라신의 용혈활성 저해도 적혈구 세포막에 생성된 톨라신 pore의 이온 통로를 막아서 나타날 것이라고 제안하였다[12].

같은 +2가 전이금속 이온임에도 염기성 pH에서 Zn²⁺와 Ni²⁺의 용혈활성 저해가 큰 차이를 보이는 것은 이들이 pH의 변화에 따라 서로 다른 이온형태로 존재하여[16,17], 톨라신이 막에 형성한 pore와의 결합력이 달라지는 것으로 생각된다. 아연 이온은 pH 6과 7에서 Zn²⁺의 형태가 대부분인 반면, pH 8에서는

주로 Zn²⁺와 Zn(OH)⁺, pH 9에서는 Zn²⁺ 형태는 거의 없고 Zn(OH)⁺와 Zn(OH)₂의 형태로 존재한다. 중성 pH에서는 톨라신의 C-말단에 있는 amine기의 양전하와 Zn²⁺가 상대적으로 반발력을 가질 수 있으나, 염기성 pH에서는 톨라신의 양전하도 감소하고, 아연 이온도 +2가가 아닌 +1가의 Zn(OH)⁺ 이온형태를 띠어 톨라신과의 결합력이 더 커질 수 있을 것으로 생각된다. 반면, 니켈 이온은 pH 6과 7에서 Ni²⁺, NiOH⁺의 형태 중 주로 Ni²⁺ 형태로 존재하며, pH 8과 9에서는 Ni²⁺, NiOH⁺, Ni(OH)₂의 형태로 존재하나 Ni(OH)₂가 주된 화학종이다. 이와 같이 두 금속이온은 염기성 pH에서 OH⁻와 결합하며 다양한 이온 형태가 되지만, 아연 이온은 염기성 pH에서 약 50%가 Zn(OH)⁺의 형태로, 니켈 이온은 주로 Ni(OH)₂의 형태로 존재하며 1 mM의 Ni²⁺을 용해하였을 때 염기성 pH에서는 Ni²⁺은 10⁻⁵-10⁻⁷ M, Ni(OH)⁺은 10⁻⁷-10⁻⁸ M까지 감소하여 톨라신 용혈활성 억제 효과가 낮아지는 것으로 보인다.

톨라신 분자의 C-말단은 lactone ring 구조를 가지며, 여기에는 amine기를 가진 두 개의 염기성 아미노산을 포함한다[18,19]. 이들의 전하량은 반응용액의 pH에 따라 달라질 수 있음을 의미한다. 이를 근거로 Kim 등[14]은 톨라신 펩티드가 중성 pH보다 염기성 pH에서 amine기의 양전하 감소로 인한 세포막 결합력 증가로 pore 형성이 용이하여 용혈활성이 증가한다고 제안하였다.

Zn²⁺에 의한 톨라신 용혈활성 저해효과는 염기성 pH에서 크게 나타났다. 반면, Ni²⁺에 의한 톨라신의 용혈활성 저해는 반응용액의 pH 변화와 무관하였다(Figs. 3과 4). 이는 pH 변화에 따른 톨라신의 용혈활성 저해에 Zn²⁺가 크게 기여하였음에도 Ni²⁺에 의한 저해가 작지만 모든 pH에서 나타났기에 이들에 의한 상승작용은 모든 pH에서 관측되었다. Ni²⁺은 T-형 Ca²⁺ 이온통로의 효과적인 저해제로서, 막에 형성된 pore와 결합하여 이온의 이동을 막는다[20]. Pore-forming 펩티드인 톨라신에서도 마찬가지로 분자다중체 결합을 통해 형성된 톨라신 pore에 Ni²⁺이 결합하여 용혈활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 이들 두 금속이온이 모두 톨라신 pore를 막아 톨라신의 용혈활성을 저해하기에 동시 처리시 각각의 저해효능이 더해져 상승효과를 보일 것이라고 쉽게 예상할 수 있다. 그러나 실제 측정된 톨라신 세포독성의 저해효과는 이들의 단순 가산치보다 더 커져 상승효과가 뚜렷하게 나타났다. 이는 톨라신에 의해 세포막에 형성된 pore를 Zn²⁺와 Ni²⁺이 함께 작용하여 저해하나 상호간에 서로의 작용을 증진시키는 또 다른 작용이 있음을 의미한다.

초록

*Pseudomonas tolaasii*에 의해 분비되는 톨라신은 펩티드 독소로서, 버섯 자실체 구조와 세포를 파괴하여 갈반병을 일으킨다. 톨라신의 독성은 용혈활성을 측정함으로써 평가하며, 이는 톨라신 분자가 적혈구 막에 pore를 형성하여 세포 구조를 파괴하기 때문이다. 이전 연구에서, Zn²⁺ 뿐만 아니라 Ni²⁺이 톨라신의 세포독성에 억제효과를 가짐을 확인하였다. Ni²⁺은 농도가 증가함에 따라 톨라신에 의한 용혈작용을 저해하였으며, 이의 K_i 값은 1.8 mM이었다. 용혈활성은 10 mM 이상의 농도에서 완전히 저해되었다. Ni²⁺의 효과는 pH에 따라 크게 변하지 않았으나,

Zn²⁺의 톨라신 세포독성 억제 효과는 염기성 pH에서 크게 증가하였다. 완충액의 pH를 7에서 9로 증가시키면, 50% 용혈작용이 일어나는 시간인 T₅₀은 1 mM Ni²⁺에 의해 조금 증가하였으나 100 μM Zn²⁺에서는 크게 증가하였다. Zn²⁺와 Ni²⁺을 반응 용액에 동시에 처리하였을 때, 두 양이온의 상승효과는 모든 pH에서 나타났다. 서로 다른 pH 의존성을 보이는 두 금속이온의 분자적 설명은 톨라신의 pore 형성과 세포 독성에 관한 기작의 이해에 기여할 것이다.

Keywords 금속이온 · 느타리버섯 · 상승효과 · 용혈작용 · 펩티드 독소

감사의 글 이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입(No. 2017R1D1A3B03032718).

References

- Jayakumar T, Thomas PA, Geraldine P (2009) In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innov Food Sci Emerg* 10: 228–234
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1–40
- Han HS, Jhune CS, Cheong JC, Oh JA, Kong WS, Cha JS, Lee CJ (2012) Occurrence of black rot of cultivated mushrooms (*Flammulina velutipes*) caused by *Pseudomonas tolaasii* in Korea. *Eur J Plant Pathol* 133: 527–535
- Kim JW, Kim KH, Kang HJ (1994) Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea: 1. On the causal organisms of the rots of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, and *Lentinus edodes*. *Korean J Plant Pathol* 10: 197–210
- Tolaas AG (1915) A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathol* 5: 51–54
- Soler-Rivas C, Arpin N, Olivier JM, Wichers HJ (1999) WLIP, a lipodepsipeptide of *Pseudomonas 'reactans'*, as inhibitor of the symptoms of the brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J Appl Microbiol* 86: 635–641
- Lee CJ, Yoo YM, Han JY, Jhune JY, Cheong JC, Moon JW, Suh JS, Han HS, Cha JS (2013) Isolation of the bacterium *Pseudomonas* sp. HCl effective in inactivation of tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Kor J Mycol* 41: 248–254
- Largeteau ML, Savoie JM (2010) Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: Biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 63–73
- Brodey CL, Rainey PB, Tester M, Johnstone K (1991) Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol Plant Microbe Interact* 4: 407–411
- Wong WC, Preece TF (1979) Identification of *Pseudomonas tolaasii*: The white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J Appl Bacteriol* 47: 404–407
- Cho KH, Park KS, Kim YK (2000) Hemolytic properties of tolaasin causing the brown blotch disease on oyster mushroom. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 190–195
- Choi TK, Wang HS, Kim YK (2009) Inhibitory effect of Ni²⁺ on the tolaasin-induced hemolysis. *J Appl Biol Chem* 52: 28–32
- Cho KH, Kim ST, Kim YK (2006) Inhibitory effect of Zn²⁺ on tolaasin-induced hemolysis. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 281–286
- Kim ST, Choi TK, Kim YK (2007) pH-dependent cytotoxicity of a peptide toxin, tolaasin. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 257–261
- Yun YB, Kim MH, Han JH, Kim YK (2017) Suppression of brown blotch disease by tolaasin inhibitory factors. *J Appl Biol Chem* 60: 179–184
- Degen A, Kosec M (2000) Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *J Eur Ceram Soc* 20: 667–673
- Hernandez N, Moreno R, Sanchez-Herencia J, Fierro JLG (2005) Surface behavior of nickel powders in aqueous suspensions. *J Phys Chem* 109: 4470–4474
- Jourdan F, Lazzaroni S, Mendez BL, Lo Cantore P, de Julio M, Amodeo P, Iacobellis NS, Evidente A, Motta A (2003) A left-handed α -helix containing both L- and D-amino acids: the solution structure of the antimicrobial lipodepsipeptide tolaasin. *Proteins* 52: 534–543
- Mortishire-Smith RJ, Nutkins JC, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, Williams DH (1991) Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph *Pseudomonas reactans*. *Tetrahedron* 47: 3645–3654
- Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E, Lee JH (2006) A molecular determinant of nickel inhibition in Ca_v3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* 281: 4823–4830