Molecular analysis of peptide toxins secreted by various *Pseudomonas tolaasii* strains

Yeong-Bae Yun¹ · Young-Kee Kim¹

다양한 *Pseudomonas tolaasii* 균주에 의해 분비되는 펩티드 독소의 분석

윤영배¹ · 김영기¹

Received: 29 September 2020 / Accepted: 30 October 2020 / Published Online: 31 December 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract *Pseudomonas tolaasii* is a pathogen causing brown blotch disease in cultivated mushrooms. In previous study, various strains of *P. tolaasii* were isolated from the mushrooms with disease symptoms and they were further divided into Pt α , Pt β , and Pt γ subtypes according to the 16S rRNA gene analysis. To investigate the secretion of peptide toxins, tolaasin and its analog peptides, culture extracts of Pt group strains were analyzed by gel permeation chromatography. Those of Pt α subtype strains contained two chromatographic peaks, band A and B. Meanwhile, those of Pt β and Pt γ subtype strains contained mainly band A component and a little of band B. Molecular weights of toxic peptides of culture extracts were measured by MALDI-TOF mass spectrometry. In Pt α subtype strains, the peptide compositions of band A and B were same including tolaasin I (1,987 Da), tolaasin II (1,943 Da), and its two analog peptides, 1,973 Da and 2,005 Da. The strains of Pt β and Pt γ subtype secreted many components of MW 1,100–1,200 Da, but they did not synthesize any tolaasin-like peptides. These results suggest that the only Pt α subtype strains secrete tolaasin and its analog peptide toxins and the strains of Pt β and Pt γ subtypes have different pathogenic characters causing brown blotch disease.

Keywords Brown blotch disease · Mass spectroscopy · Peptide composition · Tolaasin

서론

버섯은 비타민 B와 D, 항산화 물질, 불포화지방산 등 다양한 유익 성분들을 함유하고 있으며[1], 많은 연구에서는 신선한 버섯을 매일 섭취한 여성에서 유방암 발생 확률이 감소한다고 보고하였다[2]. 버섯의 다양한 효능에도 불구하고 매년 버섯의 생산량과 생산 면적은 감소하고 있으며, 이의 주된 원인 중 하나가 세균성 갈반병의 빈번한 발생이다. 버섯에 병을 일으키는 많은 세균들 중 *Pseudomonas tolaasii*는 펩티드 독소인 tolaasin을 분비하여 버섯 세포를 파괴하며, 조직을 괴사시켜 갈반병을 일으킨다. 갈반병은 버섯 갓 표면에 갈색 무늬를 형성하며 버섯 조직을 부패시켜 품질의 저하는 물론 병의 빠른 확산 속도로 후속 재배까지 불가능하게 만든다. 갈반병이 발생하게 되면 재배 농가의 다른 재배사 및 재배 단지 전체로 빠르게 확산될 수 있어, 농민들은 버섯재배를 기피하게 되고 이에 따라 버섯 재배 면적이 감소하는 추세이다[3].

Tolaasin은 *P. tolaasii*에 의해 생성되는 18개의 아미노산과 지방산인 β -hydroxyoctanoic acid로 이루어진 lipodepsipeptide로, 분자 내에 친수성 부위와 소수성 부위를 동시에 갖고 있어 양친매성(amphipathic) 펩티드 독소이다. 이 독소는 다중화결합을 통해 세포막에 pore를 형성하며, 삼투압 교란을 일으켜 버섯 세포의 파괴를 유발한다[4]. Tolaasin에 의한 발병은 alamethicin, cecropin A, ovispirin 등 다른 pore-forming 펩티드 독소의 작용 기작과 유사하다[5]. Nutkins 등[6]은 tolaasin의 1차 구조를 처음 결정하였으며, Bassarello 등[7]은 *P. tolaasii* NCPPB 2192 균주로부터 7가지의 tolaasin 유사체를 분리하였고, Shirata

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.

등[8]은 *P. tolaasii* 6041R 균주에서 8가지의 tolaasin 유사체를 분리하였으며, 이들 모두 1,987 Da의 tolaasin I (Tol I)과 1,943 Da의 tolaasin II (Tol II)가 포함되어 있음을 확인하였다. 국내 연구에서도 Cho 등[9]은 병원균인 *P. tolaasii* 6264가 tolaasin I과 tolaasin II를 분비함을 확인하였다.

이전 연구에서 충북 및 경북 지역에서 분리한 *P. tolaasii* 균주들 중 대표 균주를 선발하여 이들의 병원 특성들을 확인하였다[10]. 이를 바탕으로 본 연구에서는 다양한 시기와 장소에서 분리한 갈반병 원인균주들을 병원 특성에 따라 분류하고, 이 균주들이 분비하는 tolaasin 펩티드의 독성을 조사하였다.

재료 및 방법

Tolaasin의 분리

다양한 *P. tolaasii* 균주들을 PAF (*Pseudomonas* agar F; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, Bacto-peptone 10 g, Bacto-tryptone 10 g, glycerol 10 mL per liter) 액체 배지에 접종하여 배양한 후, 균체가 제거된 배양상청액에 30%의 ammonium sulfate를 가하고 4 °C에서 정치한 후 초원심분리하여 crude tolaasin을 얻었고, 이를 순수분리에 사용하였다. Tolaasin의 순수분리는 Cho 등[9]의 방법에 따라 수행하였으며, gel permeation chromatography와 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다. 간략히, Sephadex G-75로 충전된 column (1.7 × 45 cm)에 crude tolaasin을 가한 후, 1 mL/min의 유속으로 용출하여 각 분획에서 펩티드 물질의 함유 여부를 UV/Vis spectrophotometer (U-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 220 nm의 파장에서 확인하였다. Gel permeation chromatography로부터 얻은 tolaasin 활성을 갖는 분획들의 펩티드 분석은 Protein-Pak 60 column으로 구성된 HPLC (YL9100 Series HPLC, Younglin Co. Ltd., Anyang, Korea)를 이용하였으며, 이동상은 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)이며, 0.5 mL/min 유속의 조건에서 분석하였다.

P. tolaasii 균주들의 흰색침강선형성검정(white line test)

흰색침강선형성검정법은 *Pseudomonas reactans* ATCC 51314 균주 배양액을 PAF 고체 배지 중간에 일직선으로 접종한 후, 이와 약 5 mm의 간격을 두고 *P. tolaasii* 균주 배양액 3 µL를 점적하여 이루어졌다. 접종을 완료한 agar plate는 25 °C에서 24-48시간 동안 배양하며, 두 균주 사이에 흰색 침전 형성 여부를 확인하였다[11].

Tolaasin 및 유사 펩티드의 분자량 분석

Gel permeation chromatography로부터 얻은 각 균주들의 분획들은 질량분석기로 분석하였다. 분획에 포함된 tolaasin 및 유사체는 원활한 측정을 위해 ziptip (Millipore ziptips, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 이용하여 농축액 내의 염을 제거하였다. Matrix는 50% ACN/0.1% TFA 1 mL에 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 포화 수준으로 용해시켰다. 측정 직전에 염류를 제거한 시료를 matrix와 1 µL씩 취하여 혼합하고, 이 혼합액을 stainless steel target plate (384-well plate, Shimadzu, Tokyo, Japan)에 점적한 후 건조시켰다. Tolaasin의 분자량 측정

은 MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (ultrafleXtremeIII, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)를 이용하였다. Mass spectrum은 20 kV의 가속 전압으로 양이온 모드에서 기록되었으며, 레이저로 500번 조사하여 얻은 수치의 평균치로 나타내었다. 측정된 모든 시료의 mass to charge (m/z) 범위는 300에서 20,000 m/z까지 측정하였다. Tolaasin의 분자량을 측정하기 전, external calibration은 bradykinin, angiotensin, bombesin, renin, somatostatin 등의 다양한 standard peptide mixture로 수행하였다.

결과 및 고찰

다양한 *P. tolaasii* 변이 균주의 병원 특성

이전 연구에서 시기와 장소를 달리하여 갈반병에 감염된 버섯에서 다양한 갈반병 유발 균주들을 분리하였고, 이들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 GenBank database에 등록된 염기서열과 비교하여 *Pseudomonas tolaasii* 변이균주들(Pt 그룹)을 얻었다. Pt 그룹에 속한 균주들은 유전자 계통수 분석에서 서로 가깝게 위치하나, 세 그룹으로 나뉘어 있어 이들을 Pt α (6264, HK1-HK5)와 Pt β (HK7-HK22), Pt γ (HK23) 소그룹으로 세분류 하였다[10].

갈반병 균주들의 중요한 병원 특성은 갈반병을 유발하는 독성펩티드인 tolaasin을 합성하여 분비하는 것으로, 이것은 *P. reactans* 균주가 분비하는 펩티드 물질인 WLIP (white line inducing principle)라는 물질과 반응하여 흰색의 침전을 형성한다[12]. 이러한 반응을 이용하여 그간에 분리한 Pt 그룹 균주들의 흰색침강선형성능을 확인한 결과, 용혈활성과 갈반형성능을 모두 가진 *P. tolaasii* 6264 및 HK1-HK5 균주들만이 *P. reactans* ATCC 51314 균주와의 대치배양에서 흰색의 침전을 형성하여, Pt 그룹에 속하는 변이 균주중 Pt α 소그룹 균주들만이 tolaasin을 분비함을 확인하였다(Fig. 1). 그러나, Pt α 소그룹을 제외한 Pt β 와 Pt γ 소그룹에 속한 균주들은 모두 침전을 형성하지 않아 tolaasin류 펩티드를 생산하지 않음을 확인하였다.

Fig. 1 White line formations by Pt group strains. Colonies of *P. tolaasii* strains confronted that of *P. reactans* ATCC 51314 strain

Fig. 2 Gel permeation chromatographs of the culture extracts obtained from the representative Pt group strains. The hemolytic activities of fractions were shown on the top of each band as horizontal bars

배양액의 Gel permeation chromatography

Pt 그룹에 속하는 균주들의 병원 특성 구명을 위하여 Ptα 소그룹의 *P. tolaasii* 6264와 HK1, Ptβ 소그룹의 *P. tolaasii* HK19, Ptγ 소그룹에서 *P. tolaasii* HK23 변이주들을 각 소그룹별 대표 균주로 선발하였다. 이 균주들을 48시간 배양한 후 독성펩티드를 포함한 배양상징액을 농축한 후, gel permeation chromatography를 이용하여 균주들의 펩티드 합성 및 분비 특성을 조사하였다. 모든 균주들의 chromatogram은 조금의 차이는 있으나 앞과 뒤의 크고 작은 2개 또는 앞의 한 밴드가 얻어졌으며, 각각을 band A와 band B로 구별하였다. Gel permeation chromatography 방법을 통해 얻은 분획들 중 세포 독성을 보이는 분획을 추적하기 위하여 모든 분획에서 용혈활성을 측정하였다(Fig. 2). 균주들은 크로마토그래피 분획들 중 15-25번 분획 부근에서 높은 흡광도를 보였고(band A), 특히 Ptα 소그룹에 속한 *P. tolaasii* 6264와 HK1 균주에서는 40-60번째 분획의 두번째 흡수 밴드(band B)에서도 큰 흡광도가 얻어졌다.

각 균주들의 분획별로 용혈활성을 측정한 결과, Ptα 소그룹에 속한 *P. tolaasii* 6264와 HK1 균주는 band A와 band B 모두에서 용혈활성이 얻어졌다. Ptβ 소그룹에 속한 *P. tolaasii* HK19 균주에서는 모든 분획에서 용혈활성이 보이지 않았고, Ptγ 소그룹인 *P. tolaasii* HK23 균주는 band A에 속한 넓은 범위의 분획에서 용혈활성이 얻어졌다. *P. tolaasii* 6264의 경우, 분자량을 알고있는 펩티드와 작은 단백질을 마커로 이용하여 분획들의 분자량을 확인하였을 때, band A는 약 10^4 - 10^5 Da의 범위를 보였고, band B는 1,000-4,000 Da 범위로 확인되었다.

HPLC와 mass analysis를 통한 tolaasin 펩티드 분석

각 균주들의 배양액을 농축하여 얻은 분획들을 HPLC를 이용하여 분석하였다. Ptα와 Ptγ 소그룹에 속한 균주에서는 용혈활성을 가진 band A 분획을 분석하였고, 용혈활성이 없는 Ptβ 소그룹 균주에서는 Ptα 소그룹에서 용혈활성을 보인 분획과 같은 번호의 분획을 분석하였다(Fig. 3). Ptα 소그룹인 *P. tolaasii* 6264와 HK1 균주의 펩티드 분획에서는 각각 10.5분과 17.8분의 지연시간(retention time)에서 크고 작은 peak가 각각 나타났

Fig. 3 HPLC chromatograms of band A obtained from gel permeation chromatography

고, Ptγ 소그룹인 *P. tolaasii* HK23 균주의 분획에서도 유사하게 11.0분과 17.8분의 지연시간을 보이는 peak가 관측되었다. Ptβ 소그룹인 *P. tolaasii* HK19 균주의 분획에서는 10.2-10.8분과 17.8분의 지연시간을 갖는 매우 작은 peak들이 얻어졌다.

이러한 HPLC chromatogram을 가진 각 균주들의 분획에 포함된 펩티드의 분자량을 MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 분석하였다. 먼저 각 균주들의 mass spectrum을 비교하기 위하여, 전체 측정 범위(m/z 300-3,500)의 spectrum을 비교하였다(Fig. 4). Ptα 소그룹 균주인 *P. tolaasii* 6264 균주에서는 band A와 B 모두에서 약 m/z 2,000 부근에서 높은 intensity를 보였고, 그 외 Ptβ와 Ptγ 소그룹 균주인 *P. tolaasii* HK19와 HK23 균주는 band A에서 m/z 2,000 부근의 peak를 확인할 수 없었다. 이를 tolaasin 펩티드 유사체만을 확인할 수 있는 범위로 m/z 1,900-2,100으로 좁혀 확인하였다(Fig. 5). Ptα 소그룹 균주인 *P. tolaasii* 6264는 tolaasin I (1,987 Da) 및 tolaasin II (1,943 Da)를 비롯하여 1,973 Da와 2,005 Da의 tolaasin 유사체들을 분비하였다(Fig. 5A and 5B). 놀랍게도 band A에서 분석된 펩티드들은 모두 band B와 동일하게 얻어졌으며, 이는 band A가 tolaasin 펩티드들의 다중체형태임을 보여준다. Tolaasin 분자가 다중체를 형성하여 세포막에 pore를 형성하는 것은 이미 보고한 바 있다[13]. 그에 반해, *P. tolaasii* HK19와 *P. tolaasii* HK23 균주에서는 tolaasin 및 그 유사체를 확인할 수 없었으며, 주로 1,100-1,200 Da 사이의 m/z 범위에서 펩티드 성분들을 확인할 수 있었다(Fig. 5C and 5D). 질량 분석에 의해 얻어진 균주별 모든 펩티드들은 Table 1에 나타냈으며, Ptβ와 Ptγ 소그룹 균주는 Ptα 소그룹 균주와 펩티드 종류가 뚜렷이 다를 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 Pt 그룹에 속한 균주들의 병원 특성과 펩티드 독소 tolaasin류의 조성을 분석하였을 때, Ptα 소그룹에 속한 균주들은 모두 tolaasin I과 tolaasin II를 비롯하여 1,973 Da와 2,005 Da의 tolaasin 유사체를 분비하였다. 그러나, Ptβ 소그룹과 Ptγ 소그룹에 속한 균주는 tolaasin 유사체보다는 분자량이 작은 성분을 분비하고 있으나, 이들의 세포 독성이나 버섯에 갈반을 형성하는 활성은 확인하지 못하였다. 그럼에도 불구하고

Fig. 4 Mass spectra of peptides ranging from m/z 300 to 3500 of Pt group strains. Peptide band A and B of *P. tolaasii* 6264 were shown in (A) and (B). Band As of *P. tolaasii* HK19 and HK23 were shown in (C) and (D), respectively

이들이 용혈활성이나 갈반을 형성하는 활성을 갖고 있을 가능성을 Fig. 2에서 확인할 수 있었다. $Pt\alpha$ 소그룹 균주들의 용혈활성은 단일체의 분자량에 해당하는 band B 뿐만 아니라 분자량이 큰 band A에서도 동일하게 관측되었고, 이것은 기존의 연구에서 tolaasin의 분자다중화에 의해서 나타나는 현상임을 알 수 있다[13]. 유사하게 $Pt\gamma$ 소그룹에 속한 균주의 용혈활성은 넓은 범위의 band A 분획에서 얻어졌으나, band A에 해당하는 큰 분자는 관측되지 않았다. 이것은 아마도 1,100-1,200 Da 정도의 분자량 성분들이 다중화를 이루어 band A에 해당하는 분자량에서 활성을 보이는 것으로 여겨진다.

Tolaasin은 몇가지 효소의 순차적인 반응을 통해 생성되는 2차 대사산물이다[14]. Tolaasin의 합성 과정에 관여하는 효소들은 아미노산에 대한 특이성이 절대적이지 않아 아미노산의 서열이 조금씩 다르기에 tolaasin 유사체 분자를 생산한다. 따라서 tolaasin은 합성의 전구체나 유사 형태로 분비될 수 있으며, 이들이 배양액 중에 존재할 수 있어, $Pt\beta$ 소그룹 균주의 경우에도 완전한 tolaasin 분자보다는 전구체의 작은 분자 형태로 존재할 가능성도 배제할 수 없다. 이에 tolaasin 전구체를 포함한 펩티드들이 버섯에 갈반을 형성하는 활성을 갖는지를 조사하여야 할 것이다. Yun의 연구[15]는 $Pt\alpha$ 소그룹과 같이 용혈활성

과 갈반형성능, 흰색침강선형성능 등의 모든 병원 특성에서 양성의 결과를 보인 균주에서는 균체에 lysozyme과 sonication 처리를 통해 세포막조직을 파괴하였을 때, 세포 내에 합성 및 축적되어 있던 tolaasin 펩티드 및 유사체 성분들이 세포 밖으로 유출되어 용혈 활성이 크게 나타났다. 그러나, $Pt\beta$ 소그룹과 같이 갈반형성능에서만 양성의 결과를 보인 균주에서는 세포막을 파괴하여도 용혈활성이 나타나지 않아 펩티드의 분비능에 이상이 있기 보다는 균주 자체의 tolaasin 펩티드 합성이 이루어지지 않음을 알 수 있었다(자료미제시).

16S rRNA 유전자는 세균에 존재하는 단일 유전자로서 일반적으로 세균의 분리 및 동정에 가장 기초적인 정보로 사용된다[16,17]. 그러나, 16S rRNA 유전자 염기서열은 약 1,500 개의 짧은 염기서열로, 세균의 모든 특성을 반영하지 못하여 분류 정보로서의 이용이 제한적일 수밖에 없다[18,19]. 이전 연구에서 수행한 Pt 그룹에 속한 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열은 근소한 차이를 보였음에도, 본 연구에서 밝힌 균주들의 병원 특성 및 독성 펩티드 분비에서는 큰 차이를 보였다. $Pt\alpha$ 소그룹 균주들은 용혈활성 및 갈반형성능, 흰색침강선형성능에서 모두 양성의 반응을 보였고, tolaasin류의 펩티드를 분비하였다. 그러나, $Pt\beta$ 소그룹에 속한 균주들은 갈반형성능만 보이며 그

Fig. 5 Detailed mass spectra of peptides secreted by the representative Pt group strains. Peptides secreted by *P. tolaasii* 6264 obtained from the band A and the band B were shown in (A) and (B), respectively. Those of band A by *P. tolaasii* HK19 and *P. tolaasii* HK23 were shown in (C) and (D) at the molecular mass ranges of 1,100–1,200 Da, respectively

Table 1 Comparison of molecular weights of peptides secreted by various Pt group strains

Strain			mass/charge (m/z)								
6264	-	1148	-	-	-	-	-	1944 (Tol II)**	1974 (2 ^a , B ^b)	1988 (Tol I)*	2006 (3 ^a , C ^b)
HK1	-	-	-	-	-	-	-	1944	1974	1988	2006
HK19	-	1148	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK23	1138	1148	1152	1166	1182	1188	1210	-	-	-	-

*, **Tolaasin I and II isolated by Nutkins et al. [6] and Cho et al. [9]

^aNo. 2 and 3 peptides isolated by Shirata et al. [8]

^bB and C peptide isolated by Bassarello et al. [7]

외 다른 병원 특성에서는 음성으로 나타났고 tolaasin류의 펩티드 독소는 분비하지 않았다. 또한, Pty 소그룹에 속한 균주는 용혈활성과 갈반형성능을 보였으나, tolaasin류 펩티드는 분비하지 않았다. 따라서, 세균의 병원 특성은 16S rRNA 유전자 염기서열에 따른 분류와 반드시 일치하는 결과를 보이지는 않음을 확인할 수 있었다.

초 록

*Pseudomonas tolaasii*는 인공재배 버섯에 갈반병을 일으키는 병

원 세균이다. 이전 연구에서, 갈반병이 발생한 버섯 조직에서 다양한 *P. tolaasii* 균주를 분리하였으며, 그들은 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 Ptα와 Ptβ, Pty 소그룹으로 세분류되었다. Tolaasin 및 이의 유사 펩티드 분비를 조사하기 위하여, Pt 그룹 균주들의 배양추출액을 gel permeation chromatography로 분석하였다. Ptα 소그룹 균주들의 배양추출액은 두 개의 chromatographic band인 band A와 B로 이루어졌다. 반면, Ptβ와 Pty 소그룹 균주들의 배양추출액은 주로 band A 성분만을 가졌으며, band B는 약하게 나타났다. 배양액 중 독성 펩티드들을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 분석하였다. Ptα 소그룹 균주들에서 band A와 B의 펩티드 조성은 tolaasin I

(1987 Da)과 tolaasin II (1943 Da), 1,973 Da과 2,005 Da인 두 개의 유사 펩티드를 포함하여 동일하였다. Pt β 와 Pt γ 소그룹 균주들은 분자량 1,100-1,200 Da의 많은 성분들을 분비하였으나, 이들은 tolaasin 유사 펩티드를 포함하지 않았다. 이러한 결과는 Pt α 소그룹 균주들만이 tolaasin 및 유사 펩티드 독소를 분비하며, Pt β 와 Pt γ 소그룹 균주들은 갈반병을 일으키는 다른 병원 특성을 가짐을 보여준다.

Keywords 갈반병 · 질량 분석 · 톨라신 · 펩티드 조성

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

References

1. Lee GS, Byun HS, Yoon KH, Lee JS, Choi KC, Jeung EB (2009) Dietary calcium and vitamin D₂ supplementation with enhanced *Lentinula edodes* improves osteoporosis-like symptoms and induces duodenal and renal active calcium transport gene expression in mice. *Eur J Nutr* 48: 75–83
2. Zhang M, Huang J, Xie X, Holman CJ (2009) Dietary intakes of mushrooms and green tea combine to reduce the risk of breast cancer in Chinese women. *Int J Cancer* 124: 1404–1408
3. Annual Report for Production of Mushroom (2019) Agricultural information and statistics. Ministry of Agriculture and Forestry, Sejong, Korea
4. 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
5. Silva T, Claro B, Silva BFB, Vale N, Gomes P, Gomes MS, Funari SS, Teixeira J, Uhrikova D, Bastos M (2018) Unravelling a mechanism of action for a cecropin A-melittin hybrid antimicrobial peptide: the induced formation of multilamellar lipid stacks. *Langmuir* 34: 2158–2170
6. Nutkins JC, Mortishire-Smith RJ, Packman LC, Brodey CL, Rainey PB, Johnstone K, Williams DH (1991) Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J Am Chem Soc* 113: 2621–2627
7. Bassarello C, Lazzaroni S, Bifulco G, Lo Cantore P, Iacobellis NS, Riccio R, Gomez-Paloma L, Evidente A (2004) Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J Nat Prod* 67: 811–816
8. Shirata A, Sugaya K, Takasugi M, Monde K (1995) Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 61: 493–502
9. Cho KH, Kim ST, Kim YK (2007) Purification of a pore-forming peptide toxin, tolaasin, produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *J Biochem Mol Biol* 40: 113–118
10. Yun YB, Park SW, Cha JS, Kim YK (2013) Biological characterization of various strains of *Pseudomonas tolaasii* that causes brown blotch disease. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 56: 41–45
11. Abou-Zeid MA (2012) Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Braz J Microbiol* 43: 1137–1146
12. Coraiola M, Lo Cantore P, Lazzaroni S, Evidente A, Iacobellis NS, Dalla Serra M (2006) WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1713–1722
13. Cho KH, Wang HS, Kim YK (2009) Temperature-dependent hemolytic activity of membrane pore-forming peptide toxin, tolaasin. *J Pept Sci* 16: 85–90
14. Soler-Rivas C, Jolivet S, Arpin N, Olivier JM, Wichers HJ (1999) Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol Rev* 23: 591–614
15. Yun YB (2020) Pathogenic characterization of various phage-resistant mutant strains induced from *Pseudomonas tolaasii*. Dissertation, Chungbuk National University
16. Nemergut DR, Costello EK, Hamady M, Lozupone C, Jiang L, Schmidt SK, Fierer N, Townsend AR, Cleveland CC, Stanish L, Knight R (2011) Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. *Environ Microbiol* 13: 135–144
17. Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, Steinbrück L, Reeder J, Temperton B, Huse S, McHardy AC, Knight R, Joint I, Somerfield P, Fuhrman JA, Field D (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *ISME J* 6: 298–308
18. Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ (2011) Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* 12: 38
19. Poretzky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT (2014) Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS ONE* 9: e93827