

β -Cyclodextrin을 이용한 해수에서의 Prodigiosin의 안정성과 용해도 향상

박희용, 김태경, 한세종*, 임정한*

Enhancement of the Stability and Solubility of Prodigiosin Using β -Cyclodextrin in Seawater

Heeyong Park, Tai Kyoung Kim, Se Jong Han*, and Joung Han Yim*

접수: 2012년 2월 22일 / 게재승인: 2012년 4월 20일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This research was to examine the effects of various cyclodextrins on the solubility and stability of prodigiosin in seawater. Among them, β -cyclodextrin was found to have the best efficiency and formation of the inclusion complex was saturated when prodigiosin and β -cyclodextrin were mixed in a ratio of 1 : 8 and shaken at 25°C and pH 8.0 for 6 h. The maximum algicidal activity against *Chattonella antiqua* using the inclusion complex stored at 4°C for 5 weeks of culture was obtained, $52.28 \pm 3.41\%$, which was about 5.0 fold higher than that of control. Our results suggest that inclusion complexes of prodigiosin and β -cyclodextrin could serve as effective algicidal agents.

Keywords: Algicidal activity, *Chattonella antiqua*, Cyclodextrin, Inclusion complex, Prodigiosin

1. 서론

Prodigiosin은 *Serratia marcescens* [1,2], *Vibrio psychroerythrus* [3], *Pseudomonas magnesorubra* [4] 및 *Hahella chejuensis* [5]와 같은 다양한 미생물 등에서 생산되는 붉은 색소이다. Prodigiosin은 3개의 pyrrole ring으로 구성되는 독특한 구조

를 가지며 [6], pyrrolylpyromethene 골격을 가지는 물질의 그룹에 속하는 물질이다. Prodigiosin은 면역억제효과, 항진균효과 등을 가진다고 알려져 있으며 [7-10], 또한 여러 암세포의 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다 [11,12]. 최근 연구에서 prodigiosin은 *Chattonella antiqua*와 같은 적조생물에 대한 생물학적 방제물질로서 사용될 수 있음이 밝혀졌다 [13]. 그러나 prodigiosin의 물에 잘 녹지 않는 특성 때문에 바다에서 생물학적 방제제로서 사용하기에 많은 어려움을 겪고 있다 [14].

Cyclodextrin은 소수성의 내부와 친수성의 외부로 구성된 원통형 다당체이다 [15,16]. 이러한 구조적, 화학적 특성 때문에, cyclodextrin은 음식으로부터 콜레스테롤을 추출하거나 [17], 다이옥신 [18]이나 페놀 [19,20]과 같은 환경오염 물질을 분리해 내는 것과 같은 다양한 분야에서 흡착제로서 사용되고 있다. Cyclodextrin 내부의 치환기들은 어떤 물질의 소수성과 친수성을 조절하기 위한 연구에서 소개되거나, 색깔 변화에 의한 품질검사에서 자주 이용된다 [21]. Cyclodextrin은 물에 잘 용해되는 성질을 갖고 있어 [15], 물에 잘 용해되지 않는 소수성의 물질을 내부에 포획한 상태로 그 물질의 물에 대한 용해도를 높이는 데 이용될 수 있다.

비록 prodigiosin에 대한 여러 연구사례들이 보고되고 있지만, 해수 내에서 prodigiosin의 용해도와 안정성을 증가시키기 위해 cyclodextrin을 이용한 보고는 아직 없다.

본 연구에서는 prodigiosin과 cyclodextrin이 서로 복합체를 형성함으로써, prodigiosin의 안정성 및 용해도를 증가시키기 위해, 다양한 조건에서 prodigiosin과 cyclodextrin 간의 복합체를 형성함으로써 prodigiosin이 안전하게 보호되는 것을 증명하였고 이 복합체를 이용해 *C. antiqua*에 대한

살조력 또한 검증하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 종배양 및 발효에 의한 prodigiosin의 생산

Prodigiosin 생산 균주인 *H. chejuensis* M3349 [22]는 sucrose-based marine agar (SMA: sucrose, 10 g/L; peptone, 8 g/L; yeast extract, 2 g/L; NaCl, 10 g/L; Na₂SO₄, 12 g/L; CaCl₂, 1.8 g/L; MgCl₂, 0.7 g/L; H₃BO₃, 22 mg/L; Na₂HPO₄, 20 mg/L; Na₂SiO₃, 8 mg/L; and agar, 20 g/L)에서 25°C, 3일간 배양하였다. 충분히 자란 *H. chejuensis* M3349의 단일 colony를 취해 50 mL의 Zobell 액체배지 (peptone, 5 g/L; yeast extract, 1 g/L; and seawater, 750 mL/L)에 다시 접종하고, 25°C에서 24 시간 동안 배양하였다. Prodigiosin 생산을 위한 생물반응기 배양은 sucrose-based marine broth (SMB: sucrose, 10 g/L; peptone, 8 g/L; yeast extract, 2 g/L; NaCl, 10 g/L; Na₂SO₄, 12 g/L; CaCl₂, 1.8 g/L; MgCl₂, 0.7 g/L; H₃BO₃, 22 mg/L; Na₂HPO₄, 20 mg/L; and Na₂SiO₃, 8 mg/L)를 이용하여 5 L 배양기 (Minifors, Infors HT, Switzerland)에서 25°C 조건으로 5일간 배양하였다. 생물반응기 배양은 용존산소 농도 15% 이상, 500 rpm에서 실시하였다.

2.2. Prodigiosin의 정제

본 연구에서 사용된 prodigiosin은 전자동 preparative chromatography system (Yamazen Corporation, Japan)과 DAVISIL 633NC18E 레진 (Grace Davison Discovery Sciences, USA)을 충전한 컬럼 (50 × 150 mm)을 이용해 정제하였다. 이동상 A는 1%의 formic acid가 첨가된 메탄올, 이동상 B는 1%의 formic acid가 함유된 acetonitrile이 각각 사용되었다. Prodigiosin은 분당 30 mL의 유속으로 0~10분 동안 B 10%, 10~30분 동안 B 10~50%, 30~60분 동안 B 50~80%, 60~80분 동안 B 80~95%의 조건에서 정제하였다. Prodigiosin의 존재 여부는 분당 0.5 mL의 유속으로 0~10분 동안 B 10%, 10~30분 동안 B 10~100%의 조건에서 분석하였다.

2.3. 복합체 형성을 위한 최적조건 결정

2.3.1. 최적 cyclodextrin의 선정

Prodigiosin과 최적의 복합체를 형성하는 cyclodextrin을 선별하기 위해, α-, β-, 2-hydroxypropyl (2-HP)-β-cyclodextrin, γ-cyclodextrin 등을 사용하였다. 각 cyclodextrin과 prodigiosin의 효과적인 복합체 형성을 유도하기 위해, 각 cyclodextrin은 해수에, 그리고 정제된 prodigiosin은 아세톤에 0.5 g/L의 농도로 각각 용해시킨 후, 1:1로 섞고, 각 혼합물들을 24시간 동안 상온에서 가볍게 흔들어서 주었다. 각 물질을 용해시키기 위해 사용되었던 해수와 아세톤을 증발시킨 뒤, cyclodextrin과 prodigiosin의 복합체에 1 mL의 해수를 첨가해 완전히 녹였다. 각 샘플들은 지름 0.45 m의 필터로 한번 거른 뒤, cyclodextrin과 prodigiosin의 복합체의 양은 LC-MS (Agilent 6300 Series Ion Trap LC/MS system, Agilent

Technologies, USA)로 분석하였다. 측정된 값은 3회 반복 수행하여 표준편차를 구해 표시하였다.

2.3.2. 최적 혼합 비율

정제된 prodigiosin은 아세톤에, 그리고 cyclodextrin은 해수에, 각각 0.5 g/L의 농도로 용해하였다. Prodigiosin의 양은 고정된 채, prodigiosin에 대한 cyclodextrin의 비율은 각각 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10으로 첨가하였다. 각 혼합물은 24시간 동안 상온에서 가볍게 흔들어 주었다. 각 물질을 용해시키기 위해 사용되었던 해수와 아세톤을 증발시킨 뒤, 분석을 위한 절차는 2.3.1과 동일하게 수행하였다.

2.3.3. 최적혼합 시간

정제된 prodigiosin과 cyclodextrin을 1:8의 비율로 혼합하고, 상온에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24시간 동안 가볍게 흔들어 주었다. 각 물질을 용해시키기 위해 사용되었던 해수와 아세톤을 증발시킨 뒤 분석을 위한 절차는 2.3.1과 동일하게 수행하였다.

2.3.4. 최적반응 온도

Cyclodextrin과 prodigiosin과의 복합체 형성에 반응 온도가 미치는 영향을 알아보기 위해, 정제된 prodigiosin과 β-cyclodextrin을 1:8의 비율로 혼합하고, 6시간 동안 4, 25, 37°C에서 가볍게 흔들어 주었다. 각 물질을 용해시키기 위해 사용되었던 해수와 아세톤을 증발시킨 뒤 분석을 위한 절차는 2.3.1과 동일하게 수행하였다.

2.3.5. 최적 반응 pH

5 g의 β-cyclodextrin을 10 mL의 해수에 녹인 후 각 용액의 pH는 HCl과 NaOH를 이용해 1부터 14까지 조절하였다. 정제된 prodigiosin과 각각의 pH로 조절된 cyclodextrin을 1:8의 비율로 섞고, 모든 혼합물들은 prodigiosin과 cyclodextrin과의 복합체가 잘 형성 되도록, 25°C에서 6시간 동안 가볍게 흔들었다. 각 물질을 용해시키기 위해 사용되었던 해수와 아세톤을 증발시킨 뒤 분석을 위한 절차는 2.3.1과 동일하게 수행하였다.

2.4. 살조력 검증

Prodigiosin과 β-cyclodextrin 복합체의 안정성을 확인하기 위해, 대표적인 적조생물인 *C. antiqua*에 대한 살조력 검증을 실시하였다. *C. antiqua*는 Guillard가 제안한 f/2액체배지 [23] 30mL가 함유된 100 mL flask를 이용해 25°C에서 16시간의 명 조건과 8시간의 암 조건을 반복하면서 배양하였다. *C. antiqua*의 농도가 약 $5.0 \times 10^3/30$ mL에 도달했을 때, 다른 배양용기로 계대하면서 개체수를 유지하였다.

살조력 측정을 위해, 용매를 완전히 증발시킨 prodigiosin과 β-cyclodextrin 복합체를 4, 25, 37°C에 각각 보관하였다. Prodigiosin과 β-cyclodextrin 복합체는 7일에 한번씩 살조력을 측정함으로써, 그 안정성을 조사하였다. 7일마다 각 온도에 보관하고 있던 prodigiosin과 β-cyclodextrin 복합체는

*C. antiqua*에 대한 살조력을 측정하기 바로 직전에 1 mL의 해수를 첨가하여 충분히 녹였다. 바닥이 평평한 96 well plate에서 해수에 충분히 용해된 prodigiosin과 β-cyclodextrin 복합체 10 L와 *C. antiqua* 배양액 90 L를 혼합한 뒤, 1시간 동안 상온에 방치하였다. 2% Lugol's 염색시약을 100 L를 첨가하여 30분간 방치한 후에 살아있는 세포수를 현미경으로 확인함으로써 살조력을 측정하였다. 살조력 (%)은 초기 세포수에 대한 사멸한 세포수의 비율로 계산하였으며 3회 반복을 통해 평균 및 표준편차를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. prodigiosin의 생산과 정제

Prodigiosin 생산 균주인 *H. chejuensis* M3349를 중간균 배양액을 5 L 발효조에 접종 한지 5일만에, 최대 생산량인 4.43 g/L의 prodigiosin을 얻었다 (data not shown). 배양액을 원심 분리하여 세포고형물을 취한 후 아세톤을 배양액에 대해 1배 첨가하여 실온에서 약 20분간 교반하여 prodigiosin을 추출하였다. 이 추출물을 컬럼을 통과시켜 24.571분의 체류시간을 갖는 94.7%의 정제된 prodigiosin을 얻었다 (Fig. 1).

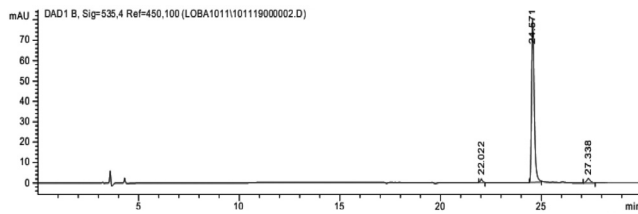


Fig. 1. Detection of prodigiosin by HPLC. The retention time of purified prodigiosin was 24.571 min, and its purity was 94.7%.

3.2. 복합체 형성을 위한 최적 비율과 시간

Cyclodextrin을 이용해, 해수에서 prodigiosin의 용해도를 증대시키기 위해, α-,β-,2HP-β-cyclodextrin,γ-cyclodextrin을 이용하여 prodigiosin과의 복합체 형성을 최적화 하였다. α-Cyclodextrin을 제외한 모든 cyclodextrin과 prodigiosin 복합체 형성은 1:8로 혼합했을 때 가장 높은 효율을 나타내었다 (Fig. 2). β-Cyclodextrin은 해수에서 prodigiosin과 복합체를 형성함에 있어서 가장 높은 효율을 보여 두 번째로 높은 효율을 보인 2HP-β-cyclodextrin 보다 약 1.3배 정도 효율이 좋았다. 더욱이, prodigiosin과 β-cyclodextrin이 1:8의 비율로 혼합했을 때, 아세톤에 대한 해수에서의 용해도 비율로 79.9 ± 7%의 높은 용해도를 나타내었다. 그 밖에, 2HP-β-cyclodextrin은 60% 이하의 용해도를, γ-cyclodextrin은 20% 이하의 아주 낮은 용해도를 각각 나타내었다. 다른 cyclodextrin과는 달리, α-cyclodextrin은 1:6의 비율로 혼합했을 때, 가장 높은 용해도를 나타내었으며, 용해도는 68 ± 8.2%를 나타내었다.

β-Cyclodextrin과 prodigiosin을 6시간 동안 가볍게 흔들면서 반응시켰을 때, 이 복합체의 해수에 대한 용해도는 아세톤에 대한 용해도에 비해 93.9 ± 9%로 가장 높은 값을 나타

내었다 (Fig. 3).

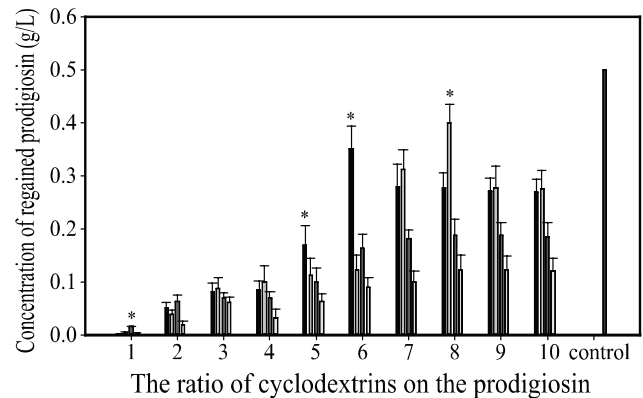


Fig. 2. Effects of various cyclodextrins and the cyclodextrin to prodigiosin ratio on inclusion complex formation (black, α-cyclodextrin gray, β-cyclodextrin dark gray, 2 HP-β-cyclodextrin and light gray, γ-cyclodextrin). Asterisks denote significant difference (P < 0.1 by t-test). Maximum efficiency was confirmed at a prodigiosin and β-cyclodextrin ratio of 1 : 8.

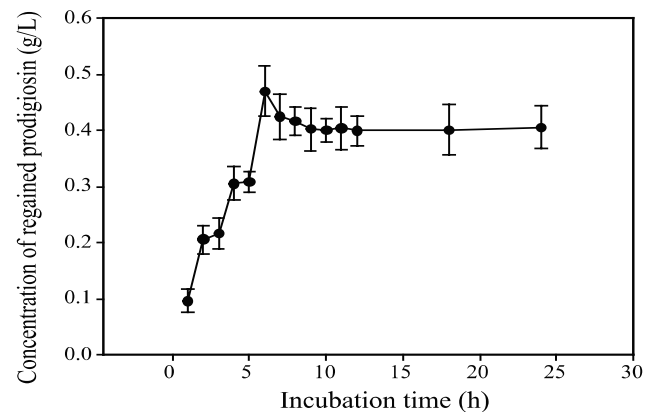


Fig. 3. Effect of the incubation time on inclusion complex formation. A 1:8 mixture of prodigiosin and β-cyclodextrin was incubated for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, and 24 h. Inclusion complex formation was saturated at 6 h.

*C. antiqua*와 같은 심각한 적조생물에 대한 생물학적 방제 후보물질로서 prodigiosin을 적용하고, 살조력을 증가시키기 위해서는 해수에 대한 용해도는 아주 중요한 성질이 될 수 있을 것이다. 본 실험에서, 부형제의 일종인 β-cyclodextrin을 이용함으로써, 해수에 대한 prodigiosin의 용해도를 향상시킬 수 있다고 사료 된다.

3.3. 복합체 형성을 위한 최적 온도 및 pH

β-Cyclodextrin과 prodigiosin 복합체 형성에 온도가 미치는 영향을 알아보기 위해 prodigiosin과 β-cyclodextrin을 1:8의 비율로 혼합하고 4, 25, 37°C에서 6시간 동안 가볍게 흔들면서 각각 반응 시켰다. 37°C에서 반응시킨 복합체가 가장 낮은 효율을 보인 반면, 25°C에서 반응시킨 복합체가 가장 높은 효율을 보였으며, 그 효율은 약 1.4배 이상 높게 나타났다 (Fig. 4).

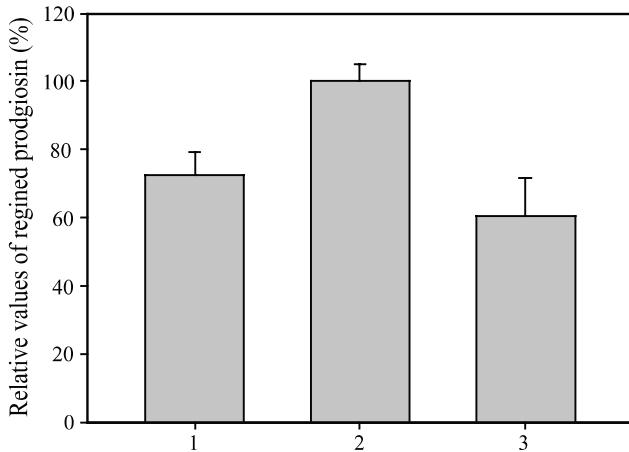


Fig. 4. Effect of temperature on inclusion complex formation (1, 4°C; 2, 25°C; and 3, 37°C). The inclusion complex at 25°C showed the highest efficiency.

β -Cyclodextrin과 prodigiosin 복합체 형성에 pH가 미치는 영향에 관한 실험에 사용된 pH 범위는 1~14까지였다. 실험 결과, pH 4에서 pH 8의 범위에서 통계적으로 유의성 있는 높은 효율을 보였으며 pH 8에서 반응시킨 복합체가 가장 높은 효율을 나타내었다 (Fig. 5). 특이하게도 pH 1부터 8까지는 β -cyclodextrin과 prodigiosin 복합체 형성 효율이 점차적으로 증가하였으나, pH 9에서부터 급격하게 감소하였다. 보통 해수의 pH는 8.15~8.25로 알려져 있으며, prodigiosin 활성의 최적 pH는 8.0~8.5로 알려져 있다 [24]. 본 실험에서 β -cyclodextrin과 prodigiosin 복합체 형성은 pH 8에서 가장 높은 효율을 보였다. Prodigiosin 용액의 색깔 역시 pH가 8에서 9로 변하는 동안 붉은색에서 오렌지색으로 변하였다. 그리고 HCl을 첨가하여 prodigiosin 용액의 pH를 9에서 8로 낮추었을 때, prodigiosin 용액의 색깔은 오렌지색에서 붉은색으로 다시 회복되었다 (Fig. 5). 본 결과들을 종합해 볼

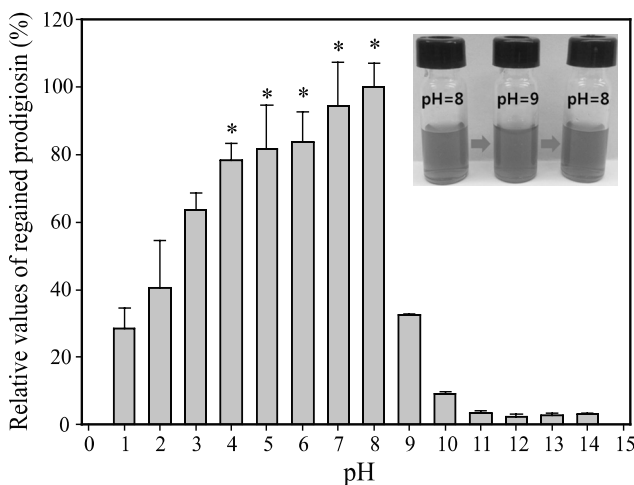


Fig. 5. Effect of pH on inclusion complex formation. The inclusion complex formed at pH 8 showed the highest efficiency. Asterisks denotesignificant difference ($P < 0.1$ by t-test). The color changed from red (pH 8) to orange (pH 9) and was restored from orange to red (pH 8) by the addition of HCl.

때, β -cyclodextrin과 prodigiosin이 복합체를 이루기 위해서는 25°C와 pH 8의 조건에서 반응 시켰을 때, 가장 높은 친화력을 나타내었으며, 본 연구에서는 β -cyclodextrin과 prodigiosin 복합체의 최적 pH와 유사한 pH를 가지는 해수에서 적조생물방제제를 개발하는데 있어서 β -cyclodextrin을 이용하면, prodigiosin과의 친화력이 높아지고, 용해도 또한 개선되어, prodigiosin을 단독으로 적용할 때 보다 더 효과적인 적조방제물질이 될 수 있을 것이라고 사료된다.

3.4. 복합체의 안정성

위 연구 결과, β -cyclodextrin과 prodigiosin이 복합체를 이루었을 때 용해도가 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 오랜 기간 동안 보관할 때 β -cyclodextrin과 prodigiosin 복합체가 안전하게 그 활성이 유지되는지가 불분명 하였다. 다양한 온도조건에서 복합체의 안정성을 확인하기 위해, 최적의 조건으로 β -cyclodextrin과 prodigiosin의 복합체를 형성하고, 용매를 증발시킨 후, 4, 25, 37°C에 5주간 보관하면서 1주에 1회 살조력 검토를 하였다.

복합체의 안정성은 4°C에서 보관했을 때, 가장 높게 유지되었으며, 5주 후에 *C. antiqua*에 대한 살조력은 $52.28 \pm 3.41\%$ 를 나타내었다 (Fig. 6). 4°C에서 보관되었던 복합체는 대조군과 비교했을 때, 약 5배 이상의 높은 살조력을 나타내었고, 그 밖에 25°C와 37°C에 5주간 보관했던 복합체의 살조력은 $35.19 \pm 8.18\%$ 와 $32.85 \pm 1.11\%$ 를 각각 나타내었으며, 보관 온도가 높아질수록 살조력은 감소되는 경향을 보였다.

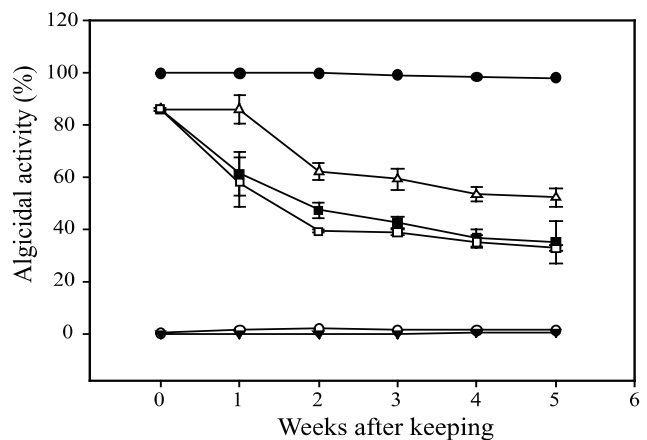


Fig. 6. Algicidal activity of the inclusion complex against *C. antiqua*. The inclusion complex of prodigiosin and β -cyclodextrin was stored at 4°C (△), 25°C (■), and 37°C (□) for 5 weeks (prodigiosin 0.5 g/L only, ● β -cyclodextrin only, ○ prodigiosin dissolved in seawater, ▽).

따라서, 본 결과들을 통해 β -cyclodextrin과 복합체를 형성한 prodigiosin을 저온에 보관할 경우, prodigiosin의 활성이 오랜 기간 대조군에 비해 안전하게 유지되는 것을 증명하였으며, 이는 β -cyclodextrin이 prodigiosin의 용해도를 증가 시키고 더불어 prodigiosin이 살조력을 나타내는 특정 부위를 보호해주는 역할을 하는 것으로 해석된다.

4. 결론

Prodigiosin과 cyclodextrin이 복합체를 형성하는데 있어서 cyclodextrin의 종류, 반응 비율, 반응 시간, 반응 온도 그리고 pH가 미치는 영향에 대해 조사하였고 이에 기초하여 대표 적조생물인 *C. antiqua*에 대해 살조력 검토를 실시하였다. 해수에서 prodigiosin의 용해도는 prodigiosin과 β-cyclodextrin을 1 : 8의 비율로 혼합했을 때 최대값을 보이는 것을 확인하였다. 그리고 β-cyclodextrin은 25℃와 pH 8.0에서 6시간 동안 혼합했을 때 prodigiosin과 가장 높은 친화력을 보였다. 본 연구는 해수에서 β-cyclodextrin을 이용해서 prodigiosin의 살조력을 증가시켜 적조방제물질로서 prodigiosin을 이용한 최초의 연구이다. 결론적으로, 대표 적조생물인 *C. antiqua*에 대한 효과적인 생물학적 방제제로서 β-cyclodextrin과 prodigiosin의 복합체를 이용하는 것은 산업적으로 아주 유용한 방법이고 또한 다른 적조에도 응용 될 것으로 사료 된다.

감사

본 연구는 한국해양연구원 부설 극지연구소 (계정번호 PE 12040)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Gerber, N. N. (1975) Prodigiosin-like pigments. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 3: 469-485.
2. Parachuri, D. K. and R. H. Harshey (1987) Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with color variation. *J. Bacteriol.* 169: 61-65.
3. D'Aoust, J. Y. and N. N. Gerber (1974) Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *J. Bacteriol.* 118: 756-757.
4. Lewis, S. M. and W. A. Corpe (1964) Prodigiosin-producing bacteria from marine sources. *Appl. Microbiol.* 12: 13-17.
5. Lee, H. K., K. J. Chun, E. Y. Moon, S. H. Ko, D. S. Lee, H. S. Lee, and K. S. Bae (2001) *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. Nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 661-666.
6. Bennett, J. W. and R. Bentley (2000) Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 1-32.
7. Soto-Cerrato, V., E. Liagostera, B. Montaner, G. L. Scheffer, and R. Perez-Tomas (2004) Mitochondria-mediated apoptosis operating irrespective of multidrug resistance in breast cancer cells by the anticancer agent prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.* 68: 1345-1352.
8. Montaner, B. and R. Perez-Tomas (2001) Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci.* 68: 2025-2036.
9. Han, S. B., S. H. Park, Y. J. Jeon, Y. K. Kim, H. M. Kim, and

- K. H. Yang (2001) Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin-2Ra expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 415-425.
10. Azuma, T., N. Watanabe, H. Yagisawa, H. Hirata, M. Iwamura, and Y. Kobayashi (2000) Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, anovel immunosuppressant. *Immunopharmacology.* 46: 29-37.
11. Montaner, B., S. Navarro, M. Pique, M. Vilaseca, M. Martinell, E. Giralt, J. Gil, and R. Perez-Tomas (2000) Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 131: 585-593.
12. Montaner, B. and R. Perez-Tomas (2002) Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.* 63: 1-7.
13. Shimada, M., T. H. Murakami, T. Imahayashi, H. S. Ozak, T. Toyoshima, and T. Okaichi (1983) Effects of sea bloom, *Chattonella antiqua*, on gill primary lamellae of the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Acta Histochem. Cytochem.* 16: 232-244.
14. Venil, C. K. and P. Lakshmanaperumalsamy (2009) An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electron J. Biol.* 5: 49-61.
15. Connors, K. A. (1997) The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* 97: 1325-1357.
16. Szejtli, J. (1998) Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* 98: 1743-1753.
17. Astray, G., C. Gonzalez-Barreiro, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, and J. Simal-Gandara (2009) A review on the use of cyclodextrins in foods. *J. Food Hydrocol.* 23: 1631-1640.
18. Cathum, S. J., A. Dumouchel, M. Punt, and C. E. Brown (2007) Sorption/desorption of polychlorinated dibenzo-P-dioxins and polychlorinated dibenzo furans (PCDDs/PCDFs) in the presence of cyclodextrins. *Soil Sedim. Contam.* 16: 15-27.
19. Yamasaki, H., Y. Makihata, and K. Fukunaga (2008) Preparation of crosslinked β-cyclodextrin polymer beads and their application as a sorbent for removal of phenol from wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 991-997.
20. Yeom, S. H., A. J. Daugulis, and S. H. Lee (2010) Bioremediation of phenol-contaminated water and soil using magnetic polymer beads. *Process Biochem.* 45: 1582-1586.
21. Basappa, C., P. Rao, D. N. Rao, and S. Divakar (1998) A modified colorimetric method for the estimation of β-cyclodextrin using phenolphthalein. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33: 517-520.
22. Kim, S. J., H. K. Lee, Y. K. Lee, and J. H. Yim (2008) Mutant selection of *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and statistical optimization of medium components for prodigiosin yield-up. *J. Microbiol.* 46: 183-188.
23. Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate. pp. 296-360. *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum, New York, USA.
24. Solé, M., N. Rius, A. Francia, and J. G. Lorén (1994) The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 341-344.