

제주도 용암 해수로 대량배양한 미세조류 멜로시라(*Melosira nummuloides*)의 성분 특성

김윤영 · 신현아 · 최정우 · 김미연 · 고경민^{1*}

(주)네추럴에프앤피, ¹(주)제이디케이바이오

Compositional Characteristics of the Microalga *Melosira nummuloides* Mass-cultured Using Jeju Lava Seawater

Yunyoung Kim, Hyun-A Shin, Jeong-Woo Choi, Mi-Yeon Kim and Gyung-Min Go^{1*}

Natural F&P Corp., Cheongju 28118, Republic of Korea

¹JDK Bio, Jeju 63296, Republic of Korea

In this study, we analyzed the compositional characteristics of *Melosira nummuloides* mass-cultured using Jeju lava seawater. *M. nummuloides* showed the highest growth rate when cultured for 14 days at 17–20°C and 15,000 lx. Proximate composition of raw-material (RM) and freeze-dried *M. nummuloides* (FM) showed high ash content (65–72%), while ethanol-extracted *M. nummuloides* (EM) had low ash and high lipid contents. The predominantly occurring mineral, Si, was 334 g/kg in RM and 269 g/kg in FM, but EM contained only 1.97 g/kg. The ratio of essential amino acids was similar in RM (38.93%) and FM (36.89%) lower in EM (17.83%), but branched chain amino acids required for muscle metabolism was high (63.40%). The polyunsaturated fatty acids of EM (34.74%) was 11% more than that in RM (23.81%), and the ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids was 1:3.6. Furthermore, the concentration of total chlorophyll was higher by 5.15 times (62.32 mg/g) and that of fucoxanthin by 7.06 times (11.02 mg/g) in EM than in RM (12.11, 1.56 mg/g, respectively). The mass cultivation and filtration of *M. nummuloides* using lava seawater has high prospects of commercialization as a competitive bio silica, cosmetic and healthy functional food material.

Keywords: *Melosira nummuloides*, Diatom, Si, Omega-3 fatty acid, Fucoxanthin

서론

광합성 미생물인 미세조류(microalgae)는 전 세계적으로 약 20–80만 종 가까이 분포하고 있는 단세포 생물이다(IPET, 2021). 미세조류는 서식 환경에 따라 담수조류와 해조류로 구분되며 계통분류학에 따라 남조류(blue green algae), 녹조류(green algae), 규조류(diatoms), 와편모조류(dinophyta) 등으로 구분할 수 있다(Ahn et al., 2013). 미세조류가 단백질, 지방산 및 색소 등 다양한 유용물질들을 생산한다는 사실이 입증되면서(Choi and Sim, 2012) 녹조류인 클로렐라, 헤마토코쿠스, 남조류인 스피루리나, 스킨조키트리움 등의 대량배양을 통한 산업적 활용이 활발하게 이루어지고 있다(Ahmed et al., 2012).

이 중 규조류는 수화된 규산염을 포함한 특이적인 세포 외벽(절두체)을 형성하며 성장하는데 종에 따라 기공의 크기와 분포가 다르고 고차원적 구조를 가지고 있다. 절두체 형태에 따라 규조류를 분리하였을 때, 약 10만 종 이상 존재하는 것으로 알려져 있으며(Tommasi et al., 2017) 사멸한 뒤에도 분해되지 않고 구조적으로 축적된다(Jiang et al., 2014). 또한, 규조류는 식물성 플랑크톤의 7가지 문(phylum)에서 가장 높은 docosahexaenoic acid (DHA) 및 eicosapentaenoic acid (EPA)를 함유한 것으로 밝혀졌다(Jónasdóttir, 2019). DHA와 EPA는 오메가-3 지방산으로 이들은 체내에서 자체적으로 생산할 수 없어 주로 어류를 통해 섭취해왔으나, 해양 오염과 야생 어종의 고갈 문제로 인하여 대체 공급원으로써 식물성 오일과 미세조류가 주목

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 759. 7746 Fax: +82. 64. 759. 7747

E-mail address: jdk8968@naver.com



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0091>

Korean J Fish Aquat Sci 55(2), 91-101, April 2022

Received 11 January 2022; Revised 3 February 2022; Accepted 11 March 2022

저자 직위: 김윤영(연구원), 신현아(연구원), 최정우(박사), 김미연(소장), 고경민(대표)

www.kci.go.kr

받고 있다(Kim et al., 2019). 이외에도, 광합성을 통해 성장하는 미세조류는 엽록소와 카로티노이드와 같은 지용성 색소 물질을 함유하고 있으며(Kim and Lee, 2015) 잔틴(xanthin), 비올라잔틴(violaxanthin), 네오잔틴(neoxanthin), 알파카로틴(α -carotene), 베타카로틴(β -carotene), 루테인(lutein) 등의 카로티노이드를 생산한다고 보고되었다(Peng et al., 2011). 갈조류와 규조류가 특이적으로 생산하는 후코잔틴(fucoxanthin)은 항산화, 항염증, 항암, 항비만 효과를 비롯한 다양한 생리활성을 갖는 카로티노이드계 색소이다(Gammone and D'Orazio, 2015). 주로 미역, 다시마 등의 거대조류가 후코잔틴 생산에 활용되고 있지만, 다당체가 함유되어 있어 분리 및 정제가 원활하지 않다. 반면, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana* 등의 미세조류에서 거대조류 대비 최소 10배 이상의 후코잔틴을 함유하고 있다는 사실이 밝혀지면서 미세조류를 산업적으로 활용하기 위한 관심이 커졌다(Xia et al., 2013).

*Melosira nummuloides*는 북반구 온대 지방의 겨울 저온기에 주로 출현하는 냉수 돌말류로서 국내에서는 강화도, 낙동강, 금강하구, 여수 근해에서 분리되었다는 기록이 있다(NIBR, 2010). 본 연구에서는 제주 용암 해수에서 식물성 플랑크톤이 채수되는 것을 확인하고, 그중 부착성 규조류인 *M. nummuloides*를 분리하였다. 용암 해수는 제주도 일부 지역에서 발견되는 바닷물로 현무암층을 뚫고 육지 지하로 흘러들어온 고농도의 미네랄을 포함한 해수이다. 일반 해수는 불안정한 외부 환경에 노출되어 있어 오염 발생 가능성이 큰 반면, 용암 해수는 화산암반층에 의해 자연정화 및 여과되어 중금속 흡착 및 유해물질이 차단된다(Kim, 2009). 또한, 연중내내 일정한 수온과 염도를 유지하고 있어 여과, 살균, 가온 장치 등의 설치가 불필요할 뿐만 아니라 해양심층수 대비 채수 비용이 25~75배 저렴해 배양수로 활용이 가능하다(Jeju Technopark, 2014). 미세조류 대량배양에 소요되는 고비용은 산업적 활용에 높은 장벽인 만큼, 이용성 확대와 비용 절감이 필요한 실정이다(Min, 2012). 따라서 본 연구는 제주 용암 해수에서 분리된 *M. nummuloides*를 용암 해수로 배양하며 온도, 조도, 배양기간에 따른 성장률을 조사함으로써 경제적인 대량배양 조건을 설정하고자 하였다. 나아가 대량배양된 *M. nummuloides*에 함유된 성분들을 활용하기 위해 가공방법에 따른 성분특성을 비교하여 고부가가치 소재로서의 활용방안을 모색하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

본 연구에 사용된 *M. nummuloides*는 (주)제이디케이바이오(Jeju, Korea)에서 제공받았으며, 군산대학교 해양생물지원학과 미세조류 연구실과 상명대 생명과학과에서 형태학적 동정을 실시하였다. 배양수조 상층부의 *M. nummuloides* 부유 군집을 채취하여 용암 해수로 현탁한 뒤 광학현미경(Nikon Eclipse

E100; Nikon Co., Tokyo, Japan)을 통해 200배 확대 관찰하며 파스퇴르 피펫 세정법(Guillard, 1973)으로 *M. nummuloides* 단일 종(species)을 순수 분리하였다. 살균한 배양수로 반복 배양하여 타 종의 유입 없이 순수분리배양된 *M. nummuloides*는 시료 동량의 질산과 4배의 황산을 첨가한 뒤 가열하여 세포 내 유기물질을 제거하였다. 그 후, 2차 증류수를 가해 원심분리기(SMART-R17; Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)를 이용하여 5~6회 이상 세척하고 건조한 뒤 영구 슬라이드를 제작하였다. 만들어진 슬라이드 표본을 광학현미경 및 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; JSM 5600-LV; JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 검경하여 수행하였다.

대량배양 조건 및 시료 제조

용암 해수에서 2~4 cells/L 정도로 분리되는 부착성 규조류 *M. nummuloides*를 대량 배양하기 위해 부착효율이 높고 회수가 용이한 망목크기 0.1~0.3 mm의 나일론 망을 부착기질로 사용하였다. 수조에 수평하게 설치하고 0.5~1 m 간격으로 절개부를 두어 광합성 작용으로 생성된 기체에 의해 수면 위로 떠오르는 것을 방지하였다. 수조에 용암 해수를 채수한 뒤 배양수 1톤당 100 g의 *M. nummuloides*를 접종하였다. 최적 대량배양 조건을 수립하기 위해 온도, 조도, 배양 기간에 대한 *M. nummuloides* 회수율을 평가하였다. 8,000 lx 조도의 순환 수조에서 14, 17, 20, 22°C 수온별로 7일간 배양한 뒤 회수하여 온도 조건을 설정하였고 19°C 수온에서 1,500, 2,000, 3,000, 5,000, 9,000, 11,000, 15,000 lx 조도를 10일간 연속 조명하여 배양량을 측정하였다. 또한, 접종 1일부터 20일까지 *M. nummuloides* 생활사(life cycle)를 매일 관찰하여 배양 종료 시점을 설정하였다. 회수한 *M. nummuloides*는 건조하여 무게를 측정한 뒤, 배양수 대비 함량으로 환산하여 나타내었다.

본 연구를 통해 설정된 대량배양 조건에 따라 *M. nummuloides*를 배양 및 회수하여 담수로 반복 세척 탈염하고 이물질을 제거한 뒤, 수분 85% 이하까지 100 μ m 여과 모지망으로 자연 탈수하여 *M. nummuloides* 원물(raw-material *M. nummuloides*, RM)을 제조하였다. RM을 활용한 동결건조물(freeze-dried *M. nummuloides*, FM)과 주정추출물(ethanol-extracted *M. nummuloides*, EM)제조 공정은 Fig. 1의 방법에 따라 행하였다. 즉, RM을 -75°C 초저온냉동고(MDF-U54V-PK; Panasonic Corp., Osaka, Japan)에서 냉동한 뒤 96시간 동안 동결건조기(FDTE-8012; Operon Co., Gimpo, Korea)에서 감압동결하고 초미립자분쇄기(DSCH-550S; Duksan Co., Ltd., Ansan, Korea)로 분쇄하여 수분함량 2%, 입자크기 100 micron 이하의 FM을 제조하였다. EM은 RM을 95% 식품용 주정 10배수를 가해 실온에서 24시간 동안 추출한 후, 5 μ m 하우징 필터로 여과하였다. 추출액은 60°C 이하의 온도에서 감압농축하여 고형분 함량 대비 2배의 텍스트린을 혼합한 뒤 분무건조기(KL-8; Seo Gang Engineering Co., Ltd., Cheonan, Korea)로 제조하였다.

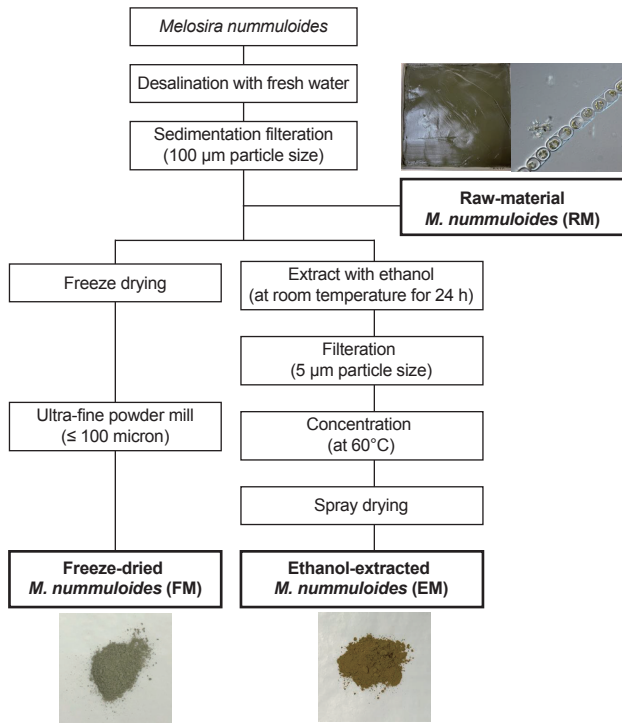


Fig. 1. Manufacturing process of raw and dried *Melosira nummuloides*

일반성분 분석

일반성분은 AOAC 표준법(AOAC, 2019)에 준하여 수분은 105°C 상압가열건조법, 지방은 Soxhlet 추출법, 단백질은 Kjeldahl법, 회분은 건식 회화법으로 분석하였다. 결과는 수분 및 텍스트린 함량을 보정하였으며 탄수화물 함량은 100에서 지방, 단백질 및 회분을 뺀 값으로 나타내었다.

무기질 분석

각 시료에 함유되어 있는 규소(Si)와 철(Fe), 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 나트륨(Na), 칼륨(K), 인(P) 및 아연(Zn) 총 8종의 무기질을 Hwang et al. (2014)의 방법을 다소 수정하여 다음과 같이 분석하였다. RM은 수분함량이 FM과 유사하도록 건조하여 사용하였고 각 시료 0.5–1.0 g을 12 mL의 질산을 가해 마이크로웨이브로 1시간 동안 분해하고 냉각시킨 뒤, 증류수로 50 mL까지 정용하여 ICP-OES (Optima 8300; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)로 분석하였다.

구성 및 유리 아미노산 분석

구성 및 유리 아미노산의 분석은 Kim et al. (2001)과 Lim et al. (2015)의 분석법을 참고하여 시료를 제조한 뒤 아미노산 자동분석기(Biochrom 20; Biochrom Ltd., Cambridge, UK)로 분석하였다. 구성 아미노산을 정량하기 위해 시료 20 mg에 6 N

염산 2 mL를 가하여 교반한 뒤 감압밀봉하여 110°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 질소 충전과 감압 건조를 반복하여 염산을 완전히 제거한 다음 0.2 N sodium citrate buffer (pH 2.2)로 50 mL까지 정용한 뒤 여과하여 사용하였다.

유리 아미노산 분석은 시료 1 g에 70% 에탄올 5 mL를 가하여 10분 동안 교반한 뒤 원심분리하여 상층액을 취한다. 상층액을 감압 건조한 다음 25 mL sample dilution buffer로 정용하고 이중 10 mL를 취하여 sulfosalicylic acid 0.5 g을 가한 뒤 냉암소에서 1시간 방치하였다. 그리고 원심분리하여 상층액 5 mL를 감압 건조한 후 0.2 N lithium citrate buffer (pH 2.2) 2 mL로 정용한 뒤 여과하여 사용하였다.

지방산 조성 분석

Morrison and Smith (1964) 및 Park et al. (2020)의 방법을 참고하여 지방산 조성을 분석하였다. 시료 약 2 g에 chloroform:methanol (2:1, v/v) 혼합액으로 지질을 추출한 후, 1.5 mL 0.5 N NaOH를 가하여 7분 동안 검화시켰다. AOAC 표준법에 따라 14% BF₃-methanol을 처리하여 지방산 메틸 에스테르화 시킨 시료를 megawax capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.25 µm; Supelco, St. Louis, MO, USA)을 장착한 gas chromatography (GC-17A; Simadzu, Kyoto, Japan)로 분석하였다. 운반 기체는 헬륨을 사용하였으며 오븐 온도는 3°C/분으로 180°C에서 230°C까지 증가시켰다. 각 지방산은 표준품과 각각의 머무름 시간을 비교하여 동정하였다.

총 엽록소 함량 분석

Kim et al. (2011)의 시험법에 따라 다음과 같이 분석하였다. 균질화한 시료 10 mg에 증류수 10 mL을 가한 뒤 60°C 항온수조(WB-11; Daihan Scientific Co., Ltd., Wonju, Korea)에서 하룻밤 방치한다. 현탁액 2 mL에 5 mL pyridine을 가해 60°C에 15분간 방치하여 추출한 뒤 원심분리(3,000 rpm, 3분)하여 상층액을 취하였다. 침전물에 pyridine 용액을 가해 상층액을 취하는 과정을 반복하여 총 10 mL가 되도록 한다. 419 nm와 454 nm에서 시험용액의 흡광도를 측정하여 아래의 계산식을 통해 총 엽록소의 양을 계산한다.

$$\text{총 엽록소(mg/100g)} = C/S \times 100$$

$$C, \text{ 엽록소(mg/L)} = 8970 \times (7.19 E_{419 \text{ nm}} + 3.33 E_{454 \text{ nm}})$$

S, 용액 2 mL에 함유된 시료의 양(mg)

E_{419 nm}, 419 nm의 흡광도

E_{454 nm}, 454 nm의 흡광도

후코잔틴 함량 분석

후코잔틴 분석은 high performance liquid chromatography (HPLC; 1200 series; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, 분석에 사용한 이동상은 Thermo

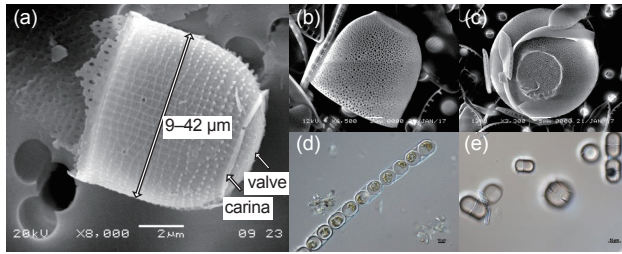


Fig. 2. Morphological observation of *Melosira nummuloides* under an SEM (a, b, c) and optical microscope (d, e). Scale bars, 2 μ m (a, b), 5 μ m (c), 10 μ m (d, e).

Fisher Scientific Solutions (Waltham, MA, USA)의 HPLC grade 시약을 표준품은 후코잔틴(16337; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 acetonitrile (A)과 증류수(B)를 제조하여 0–10분(10 → 60% A), 10–17분(60 → 100% A), 17–30분(100% A)의 조건에서 유속 0.7 mL/분으로 분석하였다. 분석시료는 0.5 g을 칭량하여 50 mL 메탄올을 가한 뒤 10분간 초음파추출기 (SD-300H; Sungdong Ultrasonic Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 추출하여 여과(0.45 μ m)한 후 10 μ L 주입하였다. 분석칼럼은 kromasil 100-5-C18 (4.6 ID \times 250 mm, 5 μ m; Nouryon, Amsterdam, Nederland)을 이용하고 35°C로 유지하면서 450 nm에서 검출하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

*M. nummuloides*의 형태학적 특징은 구형 또는 둥근 타원형 (Fig. 2e)이며 어미세포의 둘레피를 공유함으로써 대체로 딸세포와 함께 2개씩 규칙적으로 묶여 있는 염주 모양의 사상체를 이룬다(Fig. 2d). 절두체의 직경은 9–42 μ m에 각투면의 높이는 10–14 μ m로 절두체 직경에 대한 각투 높이의 비율은 0.4–1.0이며 규조류의 크기는 약 2 μ m에서 2 mm까지 넓게 분포되어 있다(NIBR, 2010). 절두체 표면은 0.08–0.09 μ m 크기의 다공성 구조로 이루어져 있으며 다공성 구멍은 중량 대비 넓은 표면적으로 에너지 및 물질 교환을 빠르고 효율적이게 한다(Hong et al., 2020). 뚜껑면(valve) 중앙부와 가장자리 사이에 환상의 막(carina)구조가 있는 것이 특징이며 중앙부에는 불규칙한 가시(corona)가 분포한다(Fig. 2a).

대량배양 조건 및 시료

*M. nummuloides*와 같은 부착성 구조의 배양은 미세조류가 증식할수록 self-shading에 의해 빛 전달률이 감소하면서 성장이 정체되고, 사멸하는 세포가 증가하여 회수량이 감소한다. 이에 최적의 대량배양 조건을 설정하기 위해 온도, 조도, 배양기간

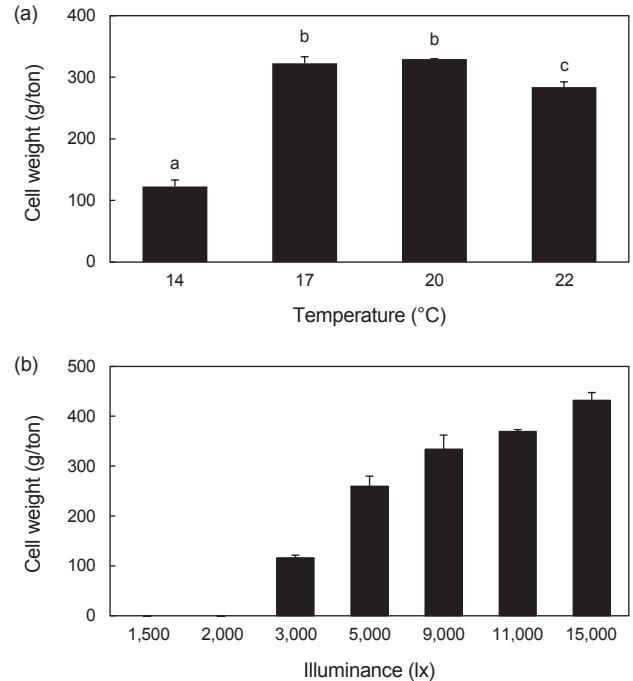


Fig. 3. *Melosira nummuloides* cell weight according to temperature (a) and illuminance (b) culture conditions. Data are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations. Different superscripts letters are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

에 따라 회수되는 미세조류의 양을 조사하였고 결과는 Fig. 3과 같다. 순환 수조를 이용하여 14, 17, 20, 22°C의 균일한 수온에서 배양한 *M. nummuloides*는 7일 후 배양수 1톤에 최초 접종한 100 g보다 각각 23, 223, 230, 184 g 증가한 회수량을 보였다. 14°C에서는 소폭 배양되어 조건에서 제외하였으며, 17, 20°C 수온 하에서 유의적으로 높은 성장을 보였다($P < 0.05$). 조도에 따른 회수량을 접종 10일 후에 비교하였을 때, 2,000 lx 이하에서는 탈락 현상이 발생하여 배양할 수 없었으나, 5,000 lx에서는 274% 성장했고 11,000 lx까지 완곡하게 증가하다가 15,000 lx에서는 부유현상이 발생하며 급격한 성장성을 보였다. *M. nummuloides*의 생활사는 4–5일에 성장하기 시작하여 7–14일간 큰 폭으로 성장한 뒤, 15일 이후로 성장이 정체되는 모습을 보였다(data not shown). 현미경을 통해 관찰한 결과 12일까지는 비교적 작고 분열중인 *M. nummuloides*를 관찰할 수 있었으나, 14일 이후로는 사멸하거나 비대해진 규조가 관찰된다. 따라서 *M. nummuloides*의 대량배양조건은 수온 17–20°C, 조도 15,000 lx에서 14일간 배양하는 것으로 설정하였다. 대량배양된 *M. nummuloides*를 Fig. 1의 조건에 따라 시료를 제조하였을 때, 수분 약 85%함유 RM에서 FM은 $10.77 \pm 0.75\%$, EM은 $2.45 \pm 0.16\%$ 의 생산 수율을 보였다. 규조류 *Chatoceros simplex*를 이용하여 배양환경에 따른 성장을 조사한 사전연구

에 따르면 25°C, 20 psu, 약 6000 lx에서 7일간 배양하였을 때 최고의 성장성을 보였으며(Yun, 2005), 동일한 *C. simplex*을 이용한 Min and Hur (2015)의 연구에서는 30°C, 33 psu에서 최고의 성장을 보였다. 미세조류의 영양소는 배지, 수확 시기 및 배양 환경조건에 따라 달라지므로 미세조류에 맞는 최적 배양 조건을 설정하는 것이 중요하다.

일반성분 함량 및 조성

*M. nummuloides*의 수분 및 텍스트린 함량을 보정한 일반성분 함량은 Table 1과 같다. RM의 단백질 20.59±0.27%, 지질 5.13±0.27%, 조회분은 72.47±2.17%, 탄수화물 1.81±0.15%로 나타났다. FM은 단백질 21.06±0.24%, 지질 3.60±0.06%, 회분 65.43±0.91%, 탄수화물 9.91±1.05%였다. 열풍건조 *M. nummuloides*의 효능을 평가한 사전연구에서 일반성분함량을 단백질 18.87%, 회분 59.24%로 보고하였으며(Noh et al., 2020) 본 연구에서 수분함량을 보정하여 나타낸 RM과 FM의 일반성분 조성과의 유사했다. EM의 일반성분 조성은 분무 건조 과정 중 첨가한 텍스트린 함량을 추가 보정하여 나타냈으며 단백질 28.53±0.67%, 지질 36.11±0.86%, 회분 13.55±0.11% 조성을 보였다. EM의 지방 함량 증가는 주정추출을 통해 후코잔틴 등의 지용성 색소 성분과 지방산이 농축되어 FM 대비 10배 까지 증가한 것으로 보인다. 반면, 주정추출 시에 RM의 회분은 18.70%만이 이행되었고 FM으로는 90.29%가 이행되었다. 녹조류 *Nannochloris coulata*와 규조류 *P. tricornutum*의 일반성분을 비교한 연구에서는 단백질 함량이 각각 43.91, 38.07%로 녹조류가 높았으며 회분 함량은 각각 21.53, 29.33%로 규조류에서 높은 것으로 나타났다(Kim et al., 2001). 본 연구 결과, FM의 단백질 함량은 21.06±0.24%로 *P. tricornutum*보다 낮으나, 회분 함량은 65.43±0.91%로 2.23배 높게 나타났다. 회분 함량의 차이는 종에 따른 절두체 두께 차이에 의한 것으로 보인다(Rodríguez-Núñez and Toledo-Aguero, 2017).

무기질 조성 및 함량

M. nummuloides 절두체를 구성하고 있는 규소 외 무기질 7종의 함량을 Table 2에 나타냈다. RM과 FM은 무기질 8종의 총 함량은 각각 339.32, 293.16 g/kg으로, 회분의 44-46%를

차지하고 있다. 두 시료에서 가장 많이 함유되어있는 무기질은 규소로 RM과 FM에 각각 334.00±5.14, 269.00±0.36 g/kg을 나타냈다. 그다음으로 RM에는 마그네슘 1.62±0.03 g/kg, 인 1.46±0.02 g/kg 순으로 함유되어있었고 FM은 칼륨 8.67±0.03 g/kg, 나트륨 5.15±0.02 g/kg, 인 5.09±0.01 g/kg 순으로 나타났다. EM에 함유된 무기질 8종의 총 함량은 RM보다 17배 적은 19.47 g/kg이었으며 다른 두 시료에서 가장 많이 함유된 무기질 규소는 0.59%만 이행된(1.97±0.02 g/kg) 반면, 나트륨(9.77±0.01 g/kg)과 칼륨(5.42±0.01 g/kg)은 규소보다 각각 5배, 3배 높은 함량이 확인되었다. 기능성 식품 소재로 널리 알려진 녹조류 *Chlorella pyrenoidosa* 건조 분말에서는 칼슘 2.44 g/kg, 철 0.8 g/kg이 함유되어 있었고(Cheng and Shih, 2005) 규소에 대한 보고는 없다. 즉, 규소는 규조류의 특징적인 미세탈로 RM에서 FM으로의 규소 이행률을 비교한 결과 334.00±5.14 g/kg에서 269.00±0.36 g/kg으로 80%가 이행되었으며 단순 건조 시에도 수득률이 높은 것으로 나타났다. 같은 규조류인 *P. tricornutum*도 410.0 g/kg의 규소를 함유한 것으로 보고되었다(Branco-Vieira et al., 2018). 규조류는 20,000 ppm 이상의 규소를 함유하고 있으며, 해수의 규소 함량을 비교했을 때, 용암 해수는 2.38 mg/kg, 일반해수는 0.21 mg/kg로 용암 해수가 11배가 높았다(JNC and KAIST, 2018). 규소[Si(OH)₄]와 마그네슘(Mg²⁺)을 주로 이용하여 세포벽을 구성하는 규조류의 성장에는 용암 해수를 활용하는 것이 일반해수보다 적합할 것으로 보고되었다(Noh et al., 2020). 최근 오염원 제거 및 나노공학 분야의 천연 소자로 적용하기 위한 규조 배양 및 활용 사례가 늘고 있다(Jang et al., 2014). 하지만 현재 규조류를 이용한 바이오 실리카는 퇴적된 규조류부터 생산되는데, 이는 단일 종으로부터 생산되는 것이 아니므로 실리카의 형태가 일정하지 않고 부가가치 분야에서의 활용은 불가능하다(Hong et al., 2020). 이에 반해 *M. nummuloides* 단일 종을 이용하여 생산한 바이오

Table 1. Proximate composition of raw and dried *Melosira nummuloides* (wt%)

Composition	RM ¹	FM ²	EM ³
Protein	20.59±0.27	21.06±0.24	28.53±0.67
Lipid	5.13±0.27	3.60±0.06	36.11±0.86
Ash	72.47±2.17	65.43±0.91	13.55±0.11
Carbohydrate	1.81±0.15	9.91±1.05	21.81±1.15

¹RM, Raw-material. ²FM, Freeze-dried. ³EM, Ethanol-extracted of *M. nummuloides*. Data are moisture content or/and dextrin correction and expressed as mean±SD of triplicate determinations.

Table 2. Mineral contents of raw and dried *Melosira nummuloides* (g/kg, dry weight basis)

Mineral	RM ¹	FM ²	EM ³
Si	334.00±5.14	269.00±0.36	1.97±0.02
Fe	0.11±0.00	0.53±0.00	0.03±0.00
Ca	0.85±0.00	1.96±0.01	0.36±0.00
Mg	1.62±0.03	2.68±0.01	1.34±0.01
Na	0.83±0.00	5.15±0.02	9.77±0.01
K	0.33±0.00	8.67±0.03	5.42±0.01
P	1.46±0.02	5.09±0.01	0.55±0.00
Zn	0.12±0.00	0.08±0.00	0.03±0.00
Total	339.32	293.16	19.47

¹RM, Raw-material. ²FM, Freeze-dried. ³EM, Ethanol-extracted of *M. nummuloides*. Data are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

실리카는 나노 다공성 특성에 의한 높은 흡수율로 동물 및 인체 지혈용 분말로의 활용을 위한 고부가가치화 연구가 보고된 바 (Lee et al., 2020), 대량배양 시 고품질의 다공성 바이오 실리카 공급원으로써도 활용 가능성이 크다.

구성 및 유리 아미노산 조성

*M. nummuloides*와 제조공정에 따른 멜로시라 분말의 구성 및 유리아미노산의 조성을 Table 3에 나타냈다. 구성 및 유리아미노산을 합한 총 아미노산은 시료별로 RM 14.17 mg/g, FM 180.78 mg/g, EM 110.14 mg/g가 함유되어 있다. RM의 필수 아미노산 비율은 구성 아미노산 중 38.93%였고 유리 아미노산 중에서는 6.25%를 차지했다. FM의 구성 아미노산 중 필수 아미노산은 36.89%로 RM과 유사한 비율을 나타냈지만, 유리 아미노산 내 필수 아미노산 비율은 12.54%로 RM 대비 2 배 증가한 함량을 보였다. RM과 FM의 구성 아미노산 중 많은 함량을 차지하고 있는 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, alanine 순으로 동일했다. RM에서 검출된 유리 아미노산은 alanine, aspartic acid, glutamic acid 순으로 많이 검출되었

으며 FM에서는 proline, valine이 추가 확인되었다. EM의 아미노산 분석결과 구성 아미노산(55.46 mg/g)과 유리아미노산 함량(54.68 mg/g)이 유사했으며 필수 아미노산 비율 또한 각각 17.83, 16.64%로 큰 차이가 없었다.

EM의 필수 아미노산은 구성 아미노산 중 leucine (2.40±0.03 mg/g), valine (2.31±0.01 mg/g), isoleucine (1.56±0.02 mg/g) 이 가장 높은 함량을 차지하고 있으며 유리아미노산에서도 유사한 경향을 보였다(leucine, 2.16±0.03 mg/g; valine, 2.06±0.03 mg/g; isoleucine, 1.34±0.02 mg/g). 동결건조한 규조(*P. tricornutum*)의 아미노산 조성을 분석한 연구에서 분지쇄아미노산 (branched-chain amino acid) 비율은 구성 아미노산에서 leucine 8.29%, valine 6.34%, isoleucine 5.28% 함량으로 FM과 유사하게 나타났다(Brown, 1991). leucine, valine, isoleucine 은 근육 단백질에 존재하는 분지쇄아미노산으로써 운동 중 근육에서 에너지원으로 가장 많이 이용되는 아미노산으로 알려졌다. leucine은 근육에서 단백질 합성을 자극하고 valine은 근육 성장과 재생을 촉진하고 에너지 생산에 관여, isoleucine은 근육 대사에 관여한다고 보고되어 있다(Kim et al., 2009). 또

Table 3. Total and free amino acid content of raw and dried *Melosira nummuloides*

(mg/g)

Amino acid	Total amino acid			Free amino acid		
	RM ¹	FM ²	EM ³	RM	FM	EM
Isoleucine	0.67±0.00	6.91±0.34	1.56±0.02	nd ⁴	0.47±0.00	1.34±0.02
Leucine	1.16±0.01	12.41±0.52	2.40±0.03	nd	0.62±0.01	2.16±0.03
Lysine	0.87±0.00	8.75±0.20	1.13±0.02	nd	0.19±0.00	0.83±0.02
Tryptophan	nd	1.80±0.02	nd	nd	0.08±0.00	0.42±0.00
Methionine	0.12±0.00	2.76±0.01	0.22±0.00	nd	0.08±0.00	0.29±0.03
Phenylalanine	0.85±0.01	8.55±0.07	0.84±0.01	0.03±0.00	0.32±0.02	1.12±0.03
Threonine	0.80±0.00	8.07±0.04	1.43±0.02	nd	0.39±0.01	0.88±0.01
Valine	0.86±0.01	8.67±0.03	2.31±0.01	nd	0.83±0.03	2.06±0.03
Essential amino acid	5.33 (38.93%)	57.92 (36.89%)	9.89 (17.83%)	0.03 (6.25%)	2.98 (12.54%)	9.10 (16.64%)
Alanine	1.23±0.02	15.10±0.64	15.00±0.16	0.27±0.00	6.00±0.04	16.73±0.23
Arginine	0.86±0.01	8.14±0.04	1.49±0.02	nd	0.38±0.00	1.51±0.03
Aspartic acid	1.59±0.04	16.75±0.51	2.04±0.01	0.12±0.00	1.43±0.02	1.23±0.01
Cystine	0.07±0.00	0.75±0.00	0.10±0.00	nd	nd	nd
Glutamic acid	1.81±0.03	26.55±0.31	16.87±0.14	0.06±0.00	9.73±0.06	14.33±0.33
Glycine	0.87±0.01	9.37±0.07	1.97±0.03	nd	0.49±0.01	1.13±0.01
Histidine	0.35±0.00	2.83±0.06	0.41±0.00	nd	0.65±0.01	nd
Proline	0.32±0.02	7.43±0.08	6.26±0.15	nd	1.79±0.03	9.20±0.04
Serine	0.83±0.03	8.08±0.07	0.99±0.03	nd	0.22±0.02	0.43±0.00
Tyrosine	0.43±0.00	4.10±0.01	0.44±0.00	nd	0.09±0.00	1.02±0.01
Non-essential amino acid	8.36 (61.07%)	99.10 (63.11%)	45.57 (82.17%)	0.45 (93.75%)	20.78 (87.46%)	45.58 (83.36%)
Total amino acid	13.69 (100%)	157.02 (100%)	55.46 (100%)	0.48 (100%)	23.76 (100%)	54.68 (100%)

¹RM, Raw-material. ²FM, Freeze-dried. ³EM, Ethanol-extracted of *M. nummuloides*. ⁴nd, Not detected. Data are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

한, 사전 연구결과에서 분지쇄아미노산의 투여가 운동 지속시간 향상(Calders et al., 1999) 및 피로 감소(Blomstrand et al., 1988) 효능이 있음이 밝혀져 근 성장을 위한 음료 및 식품에 *M. nummuloides*의 활용 가능성을 확인하였다.

포화 및 불포화 지방산 조성

*M. nummuloides*의 지방산 조성은 Table 4와 같다. RM의 지방산 조성은 포화지방산(saturated fatty acid) 47.61%, 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acid) 28.57%, 다불포화지방산(polyunsaturated fatty acid) 23.81%였으며 FM은 각각 48.36, 27.05, 24.59%로 RM과 유사한 지방산 조성을 보였다.

주된 지방산 또한 myristic acid, oleic acid, linoleic acid로 동일했으며 RM에서는 전체의 76.19%, FM에서는 90.16%의 높은 비율을 차지하고 있었다. EM의 지방산 조성은 RM대비 단일불포화지방산 비율이 10% 감소하고(18.94%) 다불포화지방산의 비율이 11% 증가하였으며(34.74%) 오메가-3와 오메가-6 계열의 필수지방산이 다양하게 검출되었다. 오메가-3 지방산인 EPA가 23.89%로 전체 지방산 중 두 번째로 높은 함량을 보였으며, 그 외에도 DHA (2.47%), eicosatrienoic acid (0.16%), linolenic acid (0.16%)과 같은 오메가-3 지방산이 전체 지방산 중 26.68% 비율을 차지하는 것으로 밝혀졌다. 오메가-6 지방산 비율은 7.41%였으며 linoleic acid (3.79%), arachidonic acid

Table 4. Fatty acid composition of raw and dried *Melosira nummuloides* (wt%)

Fatty acid	RM ¹	FM ²	EM ³
Arachidic acid	nd ⁴	nd	0.16±0.00
Behenic acid	nd	nd	0.16±0.00
Heptadecanoic acid	nd	nd	0.16±0.00
Lauric acid	nd	nd	0.33±0.01
Lignoceric acid	nd	nd	0.33±0.00
Myristic acid	33.33±5.01	45.08±6.68	18.45±3.67
Palmitic acid	nd	nd	25.54±3.84
Pentadecanoic acid	nd	0.82±0.00	0.49±0.01
Tricosanoic acid	9.52±1.22	nd	nd
Stearic acid	4.76±0.54	2.46±0.05	0.66±0.00
Saturated fatty acid (SFA)	47.61	48.36	46.28
Elaidic acid (ω-9)	nd	nd	0.16±0.00
Erucic acid (ω-9)	nd	nd	1.15±0.01
Oleic acid (ω-9)	28.57±3.11	27.05±3.07	5.44±0.46
Palmitoleic acid	nd	nd	12.19±1.96
Monounsaturated fatty acid (MUFA)	28.57	27.05	18.94
cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic acid (ω-3)*	nd	nd	0.16±0.00
cis-11,14-Eicosadienoic acid	nd	nd	0.16±0.00
cis-13,16-Docosadienoic acid	nd	nd	0.49±0.01
cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic acid (DHA) (ω-3)*	nd	nd	2.47±0.03
cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid (EPA) (ω-3)*	nd	nd	23.89±5.32
cis-8, 11, 14-Eicosatrienoic acid (ω-6)*	nd	nd	0.33±0.00
Linoleic acid (ω-6)*	14.29±2.30	18.03±2.06	3.79±0.23
Linolelaidic acid (ω-6)*	nd	nd	0.16±0.00
Linolenic acid (ω-3)*	nd	nd	0.16±0.00
Arachidonic acid (ω-6)*	9.52±1.33	4.92±0.06	2.64±0.01
γ-Linolenic acid (ω-6)*	nd	1.64±0.00	0.49±0.00
Polyunsaturated fatty acid (PUFA)	23.81	24.59	34.74
Essential fatty acid	23.81	24.59	34.09

¹RM, Raw-material. ²FM, Freeze-dried. ³EM, Ethanol-extracted of *M. nummuloides*. ⁴nd, Not detected. *Essential fatty acid. Data are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

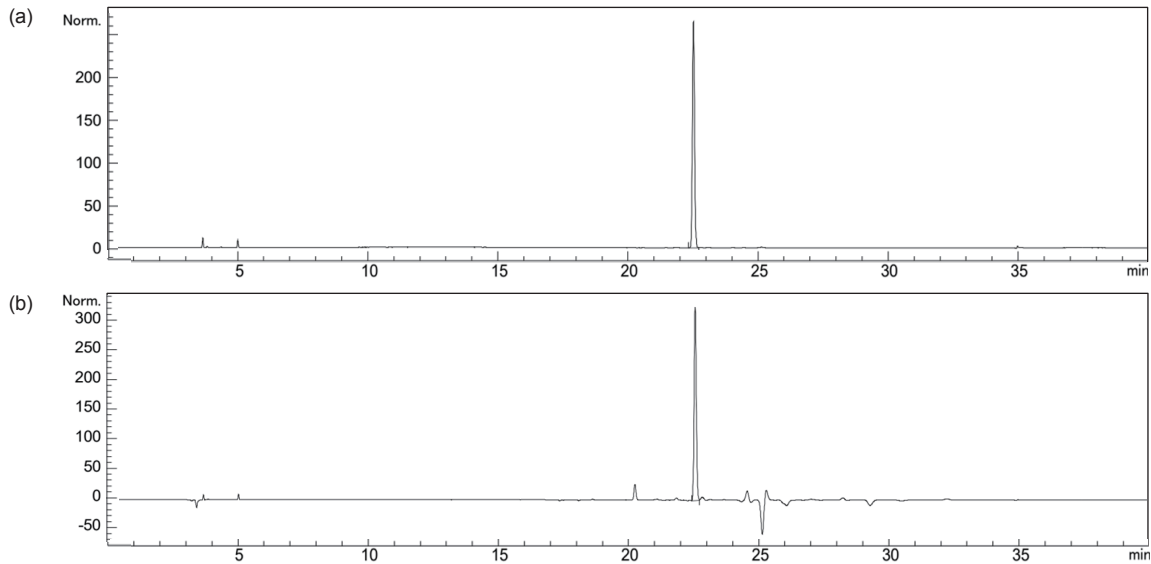


Fig. 4. HPLC chromatogram of fucoxanthin (a) and ethanol-extracted of *Melosira nummuloides* (EM) (b). Detection was carried out at 450 nm.

(2.64%), γ -linolenic acid (0.49%) 순으로 함유되어 있다. 동일한 *Melosira*속이며 멕시코 해안에서 분리된 *M. moniliformis*는 51.12% EPA와 6.19% DHA를 함유하여 뛰어난 필수 지방산 생산능력이 확인되었다(Lora-Vilchis et al., 2018). *P. tri-cornutum* 동결건조물은 포화지방산 45.52%, 단일불포화지방산 37.35%, 다불포화지방산 17.13%였으며(Kim et al., 2001) 메탄올추출물에서는 각각 41.83, 26.54, 31.63% (Foo et al., 2017)로 본 연구와 유사하게 유기용매 추출 시 다불포화지방산의 비율이 증가하는 경향을 보였다.

필수 지방산은 인체의 다양한 조절 반응에 관여하는 물질이며 체내에서 합성되지 않아 식품을 통한 섭취가 중요하지만, 식용유 산업의 발달과 서구적 식습관으로 인해 과도한 오메가-6 섭취가 문제가 되고 있다(Simopoulos, 2004). EM은 오메가-6보다 3.6배 높은 오메가-3를 함유하고 있으며 메탄올 추출한 *P. tri-cornutum*과 *Chaetoceros calcitrans* 두 규조 모두 각각 5.7, 3.25배에 달하는 풍부한 오메가-3 지방산 조성을 보였다(Foo et al., 2017). 주정추출을 통해 필수 지방산 및 오메가-3 비율을 높인 EM은 영양학적으로 우수한 지방산 조성을 갖추고 있으며 지방산 공급원으로써 활용 가능성이 크다.

총 엽록소 및 후코잔틴 함량

M. nummuloides 시료에서 총 엽록소와 후코잔틴(Fig. 4.) 함량을 조사하여 기능성 소재로써의 활용 가능성이 큰 제조 공정을 검토하였다(Table 5). 수분함량을 보정한 RM은 총 엽록소 함량 12.11 ± 0.21 mg/g (d.w.), 후코잔틴 1.56 ± 0.15 mg/g (d.w.)을 함유하고 있었다. FM의 기능성분은 건 중량 RM대비 각각 0.87, 0.67배 감소한 10.59 ± 0.17 mg/g (d.w.), 1.04 ± 0.03 mg/g (d.w.)으로 확인되었다. 반면, EM의 기능성분은 총 엽록소 19.53 ± 0.25 mg/g, 후코잔틴 3.45 ± 0.02 mg/g으로 텍스트린 및 수분 함량을 보정했을 때, 건 중량 RM 대비 5.15배 증가한 총 엽록소 [62.32 ± 0.80 mg/g (d.w.)]와 7.06배 증가한 후코잔틴 [11.02 ± 0.05 mg/g (d.w.)]을 함유하고 있었다. 규조류 *P. tri-cornutum* 동결건조물의 후코잔틴 최적 추출 용매를 검토한 결과에서도 아세톤이나 에틸아세테이트 용매로 추출했을 때보다 에탄올 추출 시 15.71 mg/g (d.w.)으로 높은 추출효율을 보였다(Kim et al., 2012). *I. galbana*, *Odontella aurita*, *P. tri-cornutum* 등 규조 10종의 후코잔틴 함량 분석한 사전연구결과 평균 3.07 mg/g (d.w.)의 후코잔틴을 함유하고 있었다(Tachihana et al., 2020). 본 실험을 통해 *M. nummuloides*가 규조류 중에서도 후

Table 5. Pigments contents of raw and dried *Melosira nummuloides* (mg/g)

Pigments	RM ¹	FM ²	EM ³
Fucoxanthin	0.23 ± 0.02 ($1.56 \pm 0.15^*$)	1.02 ± 0.03 ($1.04 \pm 0.03^*$)	3.45 ± 0.02 ($11.02 \pm 0.05^*$)
Total chlorophyll	1.82 ± 0.03 ($12.11 \pm 0.21^*$)	10.40 ± 0.16 ($10.59 \pm 0.17^*$)	19.53 ± 0.25 ($62.32 \pm 0.80^*$)

¹RM, Raw-material. ²FM, Freeze-dried. ³EM, Ethanol-extracted of *M. nummuloides*. * Moisture content or/and dextrin correction. Data are expressed as mean \pm SD of triplicate determinations.

코잔틴 함량이 높으며 다양한 생리활성 원료로써 활용 가능성이 큰 소재임을 확인하였다.

본 연구는 제주 용암 해수를 이용하여 *M. nummuloides*를 경제적인 방법으로 대량생산할 수 있는 조건을 설정하였으며, 이를 통해 생산된 *M. nummuloides* 원물 및 건조분말의 성분특성을 조사하였다. *M. nummuloides*는 수온 17–20°C, 조도 15,000 lx에서 14일간 배양했을 때 가장 높은 성장률을 보였다. 수분을 보정한 RM과 FM의 일반성분은 65–72%의 높은 회분 함량을 보였으며, 주성으로 추출한 EM은 회분 함량은 낮고, 지방 함량이 증가하였다. 무기질 8종의 총 함량은 RM과 FM 평균 316.24 g/kg이 함유되어 있고, 두 시료 모두 무기질 8종 중 규소 비율이 90% 이상인 반면, EM의 무기질은 RM보다 17배 적은 19.47 g/kg만이 이행되었으며 이 중 10.12%만이 규소였다. 구성 아미노산 중 필수 아미노산 비율은 RM 38.93%, FM 36.89%로 유사했고 EM은 17.83%로 낮았으나 근육 대사에 필요한 분지쇄 아미노산 비율이 높았다. 지방산 조성은 RM과 FM이 마찬가지로 유사한 비율 및 조성을 보였지만 주성으로 추출한 EM은 다불포화지방산 비율이 증가하였으며 오메가-3 (26.68%)가 오메가-6 (7.41%)에 비해 3.6배 많이 함유되어 있다. 기능성분 함량은 RM에 총 엽록소 12.11 mg/g, 후코잔틴 1.56 mg/g을 확인하였으며 FM에서는 각각 0.87, 0.67배 감소한 반면, EM에서는 총 엽록소(62.32 mg/g)가 5.15배 증가했고 후코잔틴(11.02 mg/g)이 7.06배 증가했다.

대량배양을 통해 생산한 FM은 무기질 구성 중 90% 이상이 규소이므로 고품질의 바이오 실리카를 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 주성추출하여 분무건조하는 것은 불포화지방산 및 후코잔틴 함량이 우수해 생리활성 효능을 높일 수 있는 추출법으로 확인된다. 이에 따라 *M. nummuloides*는 나노, 화장품 및 건강기능식품 소재로써 경제적 가치를 창출할 가능성이 큰 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 2020–2021년도 해양수산과학기술진흥원의 대량생산 시스템 및 고도화 공정개발 사업(과제번호, 20200332) 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Ahmed F, Li Y and Schenk PM. 2012. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology. In: Algal biorefinery: Sustainable production of biofuels and aquaculture feed?. Gordon R and Seckbach J, eds. Springer, Berlin, Germany, 21-41.

Ahn CY, Lee JY and Oh HM. 2013. Control of microalgal growth and competition by N: P ratio manipulation. Korean J Environ Biol 31, 61-68. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2013.31.2.061>.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2019. Official methods of analysis. 21st ed. AOAC, Washington D.C., U.S.A.

Blomstrand E, Celsing F and Newsholme E. 1988. Changes in plasma concentrations of aromatic and branched-chain amino acids during sustained exercise in man and their possible role in fatigue. Acta Physiol Scand 133, 115-121. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08388.x>.

Branco-Vieira M, San Martin S, Agurto C, Freitas MA, Mata TM, Martins AA and Caetano N. 2018. *Phaeodactylum tricornutum* derived biosilica purification for energy applications. Energy Procedia 153, 279-283. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.020>.

Brown MR. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol 145, 79-99. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90007-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90007-J).

Calders P, Matthys D, Derave W and Pannier JL. 1999. Effect of branched-chain amino acids (BCAA), glucose, and glucose plus BCAA on endurance performance in rats. Med Sci Sports Exerc 31, 583-587. <https://doi.org/10.1097/00005768-199904000-00015>.

Cherng JY and Shih MF. 2005. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. Life Sci 76, 3001-3013. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.055>.

Choi S and Sim S. 2012. Microalgal bioconversion to organic resources from CO₂. Korean Industrial Chemistry News 15, 11-24.

Foo SC, Yusoff FM, Ismail M, Basri M, Yau SK, Khong NM, Chan KW and Ebrahimi M. 2017. Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. J Biotechnol 241, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.026>.

Gammone MA and D'Orazio N. 2015. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. Mar Drugs 15, 2196-2214. <https://doi.org/10.3390/md13042196>.

Guillard RRL. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton. In: Handbook of phycological methods. Stein JR, ed. Cambridge University Press, London, U.K., 69-85.

Hong HJ, Ryu BG and Kim JM. 2020. Technological trend of diatom bio-silica extraction and utilization. News and Information for Chemical Engineers Reprot, 38, 446-473.

Hwang J, Bae N, Oh M, Kim S, Shim Y, Kim S, Choi Y and Nam J. 2014. Method validation for 9 types of minerals in infant and adult nutritional formulas using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Food Eng Prog 18, 256-260. <https://doi.org/10.13050/foodengprog.2014.18.3.256>.

IPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry). 2021. The latest trends in microalgae and implications for agro-food fields.

- IPET i ISSUE Report, 1-14.
- Jang EK, Shin HK and Paek SP. 2014. Recent researches for diatom as inorganic and bioenvironmental materials. KSBB J 29, 9-21. <https://doi.org/10.7841/ksbbj.2014.29.1.9>.
- Jeju Technopark. 2014. What is magma seawater?. Retrieved from <http://www.jejulavawater.com/intro/individuality.do> on Feb 9, 2022.
- Jiang W, Luo S, Liu P, Deng X, Jing Y, Bai C and Li J. 2014. Purification of biosilica from living diatoms by a two-step acid cleaning and baking method. J Appl Phycol 26, 1511-1518. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0192-3>.
- JNC and KAIST (Korea Advanced Institute of Science and Technology). 2018. DIABLO: Development of a diatom-based powder hemostatic agent (blood stopper) cultured in saltwater in Jeju. Ministry of SMEs and Startups, Sejong, Korea.
- Jónasdóttir SH. 2019. Fatty acid profiles and production in marine phytoplankton. Mar Drugs 17, 151. <https://doi.org/10.3390/md17030151>.
- KIGAM (Korea institute of geoscience and mineral resources). 2021. Mineral commodity supply and demand 2020/2021. Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, Daejeon, Korea, 1-261.
- Kim B. 2009. Metabolic activity of desalted underground seawater of Jeju. M.S. Thesis, Jeju National University, Jeju, Korea.
- Kim HY, Kim IH and Nam TJ. 2009. Effects of *Capsosiphon fulvescens* extracts on essential amino acids absorption in rats. J Life Sci 19, 1591-1597. <https://doi.org/10.5352/jls.2009.19.11.1591>.
- Kim OJ and Lee JH. 2015. Characterization of *Chlorella Vulgaris* mutants generated by EMS (Ethyl Methane Sulphonate). Appl Chem Eng 26, 265-269. <https://doi.org/10.14478/ace.2015.1007>.
- Kim SK, Baek HC, Byun HG, Kang OJ and Kim JB. 2001. Biochemical composition and antioxidative activity of marine microalgae. J Korean Fish Soc 34, 260-267.
- Kim SM, Jung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D and Pan CH. 2012. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricoratum*. Appl Biochem Biotechnol 166, 1843-1855. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9602-2>.
- Kim U, Cho DH, Heo J and Kim HS. 2019. Isolation and characterization of indigenous marine diatom *Achnanthisdium* sp. BS-001 producing a high content of omega-3 fatty acid and fucoxanthin production. J Mar Biosci Biotechnol 11, 14-22. <https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.1.014>.
- Kim Y, Lee E, Han J, No G, Lim D, Jung J and Park Y. 2011. Improvement of total chlorophyll analytical methods for the chlorella products with extended products types. J Food Hyg Saf 26, 70-75.
- Lee J, Lee HA, Shin M and Juang LJ. 2020. Diatom frustule silica exhibits superhydrophilicity and superhemophilicity. ACS Nano 14, 4755-4766. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00621>.
- Lim HJ, Kim JK, Cho KM, Joo OS, Nam SH, Lee SW, Kim HJ and Shin EC. 2015. Analysis of nutritional components, volatile properties, and sensory attributes of *Cynanchi wifordii* radix: characterization study. J Korean Soc Food Sci Nutr 44, 564-572. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.4.564>.
- Lora-Vilchis MC, Huanacuni-Pilco JI, López-Fuerte FO and Pérez-Rojas CA. 2018. Growth rate, lipid, fatty acids, and pigments content of *Melosira moniliformis* (Bacillariophyta) in laboratory cultures. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal 9, 1-16.
- Min BH. 2012. Dietary value of three microalgal species for seedling production of the ark shell *Scapharca broughtonii*. Ph. D. Dissertation, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Min BH and Hur SB. 2015. Optimum culture condition of four species of microalgae used as live food for seedling production of bivalve. Korean J Malacol 31, 35-41. <https://doi.org/10.9710/kjm.2015.31.1.35>.
- Morrison WR and Smith LM. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J Lipid Res 5, 600-608.
- NIBR (National Institute of Biological Resources). 2010. Freshwater Diatom. In: Algal flora of Korea. Joh G, ed. National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea, 115-117.
- Noh YH, Kim KH, Moon HN, Go GM and Yeo IK. 2020. Effect of dietary supplementation of diatom *Melosira nummuloides* and lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* on the growth and immune stimulation responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 53, 597-605. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0597>.
- Park J, Kwak WJ, Shim KB, Kim PH and Jang M. 2020. Characterization and refining of *Berryteuthis magister* viscera oil. Korean J Food Preserv 27, 906-914. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2020.27.7.906>.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF and Wang JH. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. Mar Drugs 9, 1806-1828. <https://doi.org/10.3390/md9101806>.
- Rodríguez-Núñez K and Toledo-Aguero P. 2017. Fatty acids profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costa Rican Pacific Coast. Grasas y Aceites 68, e209. <https://doi.org/10.3989/gya.1276162>.
- Simopoulos AP. 2004. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. Food Rev Int 20, 77-90. <https://doi.org/10.1081/FRI-120028831>.
- Solymosi K and Mysliwa-Kurczel B. 2017. Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. Mini-Rev Med Chem 17, 1194-1222. <http://doi.org/10.2174/1389557516666161004161411>.

- Tachihana S, Nagao N, Katayama T, Hirahara M, Yusoff FM, Banerjee S, Shariff M, Kurosawa N, Toda T and Furuya K. 2020. High productivity of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin by a marine diatom *Chaetoceros gracilis* in a semi-continuous culture. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 602-721. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602721>.
- Tommasi ED, Gielis J and Rogato A. 2017. Diatom frustule morphogenesis and function: a multidisciplinary survey. *Mar Genomics* 35, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.07.001>.
- Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q and Zhang C. 2013. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar Drugs* 11, 2667-2681. <https://doi.org/10.3390/md11072667>.
- Yun HY. 2005. Growth of culture environment on food organism. M.S. Thesis, Mokpo National University, Mokpo, Korea.