

해양심층수 미네랄추출물의 설치류 단회투여 독성시험 평가

지 호¹ · 백성진² · 문덕수^{3,†}

¹선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 연구원

²(주)크로엔 CI-바이오융합연구소 책임연구원

³선박해양플랜트연구소 해수에너지연구센터 책임연구원

Single Dose Toxicity Assessment of Rodents for Deep Sea Mineral Extracts

Ho Ji¹, Seong Jin Baek², and Deok Soo Moon^{3,†}

¹Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

²Principal Researcher, CRI Bio Convergence Institute, Croen Inc., Suwon 16229, Korea

³Principal Researcher, Seawater Energy Plant Research Center, Korea Research Institute of Ships and Ocean Engineering, Goseong 24747, Korea

요 약

지속적인 경작으로 인한 토양의 미네랄 결핍과 식품의 가공 과정에 일어나는 손실 등으로 인해 5대 영양소 중의 하나인 미네랄이 현대인들에게 충분히 공급되지 않아 결핍되어 있다. 해양심층수에서 추출한 활성미네랄은 높은 농도의 미네랄을 섭취할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 용도로 사용하여 현대인에게 양질의 미네랄을 제공할 수 있다. 해양심층수 미네랄을 건강식품 미네랄 보충제로 사용을 활성화시키고, 고부가가치를 창출하기 위해서는 과학적인 검증을 통한 안전성 확보가 무엇보다 중요하다. 안전성 확보를 위하여 식품의약품안전처에서 규정한 가이드라인에 따라 동물독성시험을 GLP 기관에서 시행하였다. 동물시험 항목으로 설치류에 대하여 단회투여 독성시험을 시행했으며, 이상반응 및 독성결과가 나타나지 않았다.

Abstract – Due to the deficiency of minerals in the soil due to continuous cultivation and losses in the processing of food, minerals, one of the five nutrients, are lacking due to insufficient supply to modern people. Activated minerals extracted from deep seawater can not only consume high concentrations of minerals, but can also be used for various purposes to provide high-quality minerals to modern people. In order to promote the use of deep seawater minerals as a mineral supplement for healthy foods and to create high added value, it is most important to secure safety through scientific verification. To ensure safety, the animal toxicity test was conducted by the GLP organization according to the guidelines prescribed by the Ministry of Food and Drug Safety. As a test item for animals, a single-dose toxicity test was conducted on rodents, and no adverse reactions and toxicity results were observed.

Keywords: Deep seawater mineral(해양심층수 미네랄), Single dose toxicity test(단회투여 독성시험), Ministry of food and drug safety(식품의약품안전처), GLP(비임상 시험 기준 실험실), Fluorescence spectroscopy(안전성)

1. 서 론

해수는 무궁무진한 자원으로 육상 자원 고갈로 인한 그 중요성이 증대되고 있다. 특히 육상 담수가 부족한 경우 해수담수가 육상 담수를 대신할 수 있다. 국내에서는 대표적으로 해수담수화 사업이 해양심층수로 이뤄지고 있다. 해양심층수는 태양광이 도달하지 않는

수심 200 m 이상의 깊은 곳에 존재하는 유해중금속, 유기물이나 병원균 등이 거의 없을 뿐 아니라 해양식물의 성장에 필수적인 영양염류가 풍부하여 인체의 구성원소와 유사한 조성을 하고 있다(Ji *et al.*[2014]). 수심 200 m 이상에 부존하는 해양심층수는 저온 안정성, 부영양성, 청정성 등의 자원적 특성을 가지고 있어, 이러한 해양심층수를 활용하여 먹는 물로 만들어 상품화하는 사업이 활발히 이뤄지고 있다(Moon *et al.*[2004]). 또한 먹는 물을 생산하고 부수

[†]Corresponding author: dsmoon@kriso.re.kr

적으로 생성되는 농축수를 활용한 여러 제품들이 개발 되고 있는 실정이다. 이러한 농축수는 인체에 필요한 무기성분의 여러 미네랄 들을 다량 함유하고 있다. 최근에는 고경도 먹는 해양심층수를 활용하여 고지혈, 당뇨, 콜레스테롤 등의 개선방안을 위한 동물실험 결과도 유의미하게 나오고 있다(Ha *et al.*[2016]; Lee *et al.*[2016]). 당뇨 전단계의 사람을 대상으로 실시한 혈당 및 지질 지표의 개선 효과를 평가하는 임상시험 결과, 8주간 해양심층수 고경도미네랄 탈염수 섭취가 체내 인슐린 저항성을 개선시키는 효과를 확인할 수 있었다. 더불어 혈중 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤이 감소되는 효과도 확인되었다(Ham and Shon[2020]). 이러한 고경도 먹는 해양심층수의 시험결과를 바탕으로 고경도 해양심층수 농축수를 증발 건조시켜 분말형태로 만든 해양심층수 미네랄 추출물의 기능성이 대두되어지고 있다. 해양심층수 미네랄추출물은 해수담수화 과정에서 나오는 농축수를 증발시켜 얻는 방법, 전기분해 방법 등으로 얻을 수 있으며, 최근에는 막 분리, 전기투석, 이온교환 등을 이용한 방법들도 소개되어지고 있다(Ji *et al.*[2014]; Ji *et al.*[2015]).

해양심층수 미네랄추출물이 식품원료로 쓰이기 위해서는 기능성과 더불어 안전성이 확보되어야 사용할 수 있다. 이러한 안전성검사 절차는 식품의약품안전처에서 규정한 가이드라인에 따라 GLP(Good Laboratory Practice) 인증기관에서 진행되어야 한다(NIFDS[2019]). 본 연구에서는 해양심층수 미네랄추출물의 단회투여 동물독성시험을 설치류에 대하여 진행하여 안전성을 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 해양심층수 미네랄추출물의 제법 및 성분

본 연구에서는 강원도 고성 앞바다의 해안가로부터 약 3 km, 해수면으로부터 약 300 m 지점에서 취수한 해양심층수를 사용하여 실험을 수행하였다. 사용한 해양심층수의 초기 염도는 3.4 wt%이며, 역삼투 공정과 감압증발공정을 걸쳐 마그네슘염을 추출하였으며, 제조한 미네랄추출물은 해양수산부 고시 제 2015-112호 ‘해양심층수 미네랄추출물의 정의, 원료기준, 제조·가공기준, 제품규격 및 시험방법’에 적합하며, 미네랄추출물의 정보는 Table 1과 같다.

Table 1. Deep seawater magnesium salt information

명칭	해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)
화학명	염화마그네슘 + 황산마그네슘 + 산화마그네슘
제공일	2017년 01월 23일
제공량	1004.31 g(용기포함)
외관 및 색상	흰색 고체분말
제조일	2016년 04월
유효기간	제조일로부터 3년
순도	79%
보관조건	상온, 제습
공급	선박해양플랜트연구소
취급시 주의사항	건조 보관

Table 2. Rat gender, number of animals, age and weight range

	성별	수컷	암컷
동물 수	입수 시	22	22
	투여개시 시	20	20
주령	입수 시	7	7
	투여개시 시	8	8
체중범위	입수 시	190.72 ~ 205.53 g	153.78 ~ 174.63 g
	투여개시 시	219.36 ~ 246.58 g	163.13 ~ 188.72 g

2.2 해양심층수 미네랄추출물의 설치류 단회투여 독성시험 방법

독성시험은 GLP인증기관인 ㈜크로엔에서 진행하였으며, 시험군으로 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 랫드는 다양한 종류의 물질에 대한 독성을 평가하는데 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험 기초자료가 있으므로 본 시험의 실험동물로 선택하였다. 시험물질 대조군(0 mg/kg), 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg 및 5,000 mg/kg 을 투여하는 시험물질 투여군과 부형제를 투여하는 대조군을 설정하였고, 각 군당 암수 5 마리를 사용하였다(Table 2참조). 관찰항목으로는 시험물질을 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 하였다(NIFDS[2019]).

랫드의 검역은 입수 시 모든 동물의 수와 상태를 관찰하였고, 동물 공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험 기초자료로 보관하였다. 모든 동물은 동물실 환경에 적응하기 위해 9일의 순화기간을 두었다. 순화기간 동안 모든 동물은 매일 1 회 순화기간 증상을 관찰하였으며, 순화기간 중 건강한 개체로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 평균체중에서 벗어난 동물은 제외하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포 되도록 지그재그로 분배하여 군 분리 하였다. 잔여동물은 군 분리 종료 후 시험계로부터 제외시켰으며, 이후 해당 SOP에 따라 처리 하였다. 랫드는 Table 3와 같은 사육환경에서 관리 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 해양심층수 미네랄추출물 랫트 경구투여 독성 시험

본 시험에서는 식품임을 감안하여 의약품 단회 투여 독성시험의 한계용량인 2,000 mg/kg 보다 높은 5,000 mg/kg을 고용량군으로 설정하고 아래로 2,500 mg/kg, 1,250 mg/kg, 대조군 0 mg/kg을 포함하여 총 4개 군을 설정하였다. 그리고, 대조군은 해양심층수 미네랄 추출물의 독성 비교를 위하여 설정하였으며, 시험군 및 투여량은 Table 4과 같이 설정하였다.

투여경로는 임상 예정경로인 경구 투여를 선택하였으며, 총 투여량을 1 회/일, 15:00 이전에 투여 하였다. 투여액은 10 mL/kg 으로 하고, 개체별 투여액은 절식 후 투여당일의 체중을 기준으로 산출하였다. 투여 전에 음수는 자유섭취 시키면서 약 12 시간 이상 절식시켰다. 시험물질은 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기로 위 내에 강제투여 하였으며, 첫 투여 후 약 3~4 시간 후에 사료를 공급하였다. 투여당일(0 일)에 첫 투여 후 30 분까지는 적어도 1회

Table 3. Rat breeding environment

동물실험번호	동물실험 4
사육상자 정보	철망 사육상자(W 180 × L 400 × H 200 mm)
사육밀도	순화기간: 2마리 이하 / 사육상자 관찰기간: 1마리 이하 / 사육상자
온도	20.18 ~ 21.86 °C
상대습도	45.22 ~ 62.94 %
환기횟수	20회 이상/시간
조명주기	12시간(Am 8 ~ Pm 8)
조도	150 ~ 300 lx
사육관리	사육상자 및 급이기 1회 이상 / 2주, 급수병 1회 이상 / 1주 교환
사육환경보고	실험기간 중 동물에게 이상을 줄만한 이상사태는 발생하지 않음

Table 4. Test group and dosage

군	투여량(mg/kg)	투여액량(mL/kg)	동물 수(동물번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	10	5 (1101 ~ 1105)	5 (2101 ~ 2105)
G2 저용량군	1,250	10	5 (1201 ~ 1205)	5 (2201 ~ 2205)
G3 중용량군	2,500	10	5 (1301 ~ 1305)	5 (2301 ~ 2305)
G4 고용량군	5,000	10	5 (1401 ~ 1405)	5 (2401 ~ 2405)

이상, 1, 2, 3 및 4 시간 에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다.

게서 자발운동의 저하가 관찰되었다(Table 5).

3.2 해양심층수 미네랄 추출물 독성시험 일반증상

투여 후 1일부터 14 일까지는 매일 1 회 일반증상을 관찰하였으며, 체중은 전자저울(GF-2000, AND, Korea)을 사용하여 동물입수 시, 군 분리 시, 투여당일(투여 전), 투여 후 1, 3, 7 일 및 14 일(부검일)에 측정하였다. 관찰기간 종료 후, 모든 생존동물에 대해서 CO₂ 가스를 흡입 시켜 후대정맥/복대동맥에서 방혈 하여 안락사 시키고 부검하여 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 또한 체중은 일원배치 분산분석(One-way ANOVA test)으로 군간 비교하고, P<0.05인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS(IBM SPSS Statistics, ver. 24)를 이용하여 실시하며, P<0.05인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

시험결과 모든 시험군에서 사망개체가 관찰되지 않았다. 그리고 일반증상 관찰 시 수컷의 고농도 시험물질 투여군인 5,000 mg/kg 에서 시험물질 투여 후 0.5 시간, 1 시간, 2 시간에 한 마리에게서 복외위(prone position), 창백(paleness), 저체온증(hypothermia)이 관찰되었으며, 3 시간과 4 시간에는 2 마리에게서 자발운동의 저하(decrease of locomotor activity)가 관찰되었다. 또한 시험물질 투여 후 1일, 2 일에는 자발운동의 저하가 관찰되었고 3 일에는 사료섭취량의 감소가 관찰되었다(Table 4). 암컷의 고농도 시험물질 투여군인 5,000 mg/kg 에서 시험물질 투여 후 0.5 시간과 1 시간에 한 마리에게서 자발운동의 저하가 관찰되었고, 투여 후 3 시간과 4 시간에 3 마리에게서 자발운동의 저하가 관찰되었으며. 시험물질 투여 후 1 일에 한 마리

3.3 해양심층수 미네랄 추출물 독성시험 임상증상

부형제를 투여한 모든 대조군에서는 임상증상이 관찰되지 않았다. 체중변화는 암수 시험물질 투여군 체중이 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, 부검결과도 Table 6와 같이 암수 모두에서 이상소견 관찰되지 않았다.

4. 결 론

본 연구에서는 시험물질 해양심층수 미네랄추출물(마그네슘염)을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여 시 나타나는 개략의 치사량과 독성반응을 알아보기 위하여 수행하였다. 시험군으로는 시험물질 1,250, 2,500 및 5,000 mg/kg을 투여하는 시험물질 투여군과 부형제를 투여하는 대조군을 설정하였고, 각 군당 암수 5 마리를 사용하였다. 관찰항목으로는 시험물질을 투여한 후 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 모든 시험군에서 사망개체가 관찰되지 않았으며, 암수 시험물질 투여군에서 체중변화는 관찰되지 않았다. 부검소견에서는 모든 시험군에서 이상소견이 관찰되지 않았다. 이상의 결과, 본 시험 조건에서 시험물질에 의한 특기할 만한 독성학적 변화는 관찰되지 않았고 개략의 치사량(Approximate lethal dose: ALD)은 암수 모두 5,000 mg/kg 이상으로 판단하였다. 이러한 결과들을 바탕으로 해양심층수 미네랄추출물의 설치류 단회투여 독성시험에 대한 안전성을 확인할 수 있었으며, 추후 설치류 13주 반복 경구 투여 독성시험과 비설치류에 대한 독성시험을 진행할 수 있을 것으로 판단된다.

Group(Male)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Hours													
			0.5	1	2	3	4									
G1 0	1101		-	-	-	-	-									
	1102		-	-	-	-	-									
	1103		-	-	-	-	-									
	1104		-	-	-	-	-									
	1105		-	-	-	-	-									
G2 1,250	1201		-	-	-	-	-									
	1202		-	-	-	-	-									
	1203		-	-	-	-	-									
	1204		-	-	-	-	-									
	1205		-	-	-	-	-									
G3 2,500	1301		-	-	-	-	-									
	1302		-	-	-	-	-									
	1303		-	-	-	-	-									
	1304		-	-	-	-	-									
	1305		-	-	-	-	-									
G4 5,000	1401	Prone position	+	+	+	-	-									
		Paleness	+	+	+	-	-									
		Hypothermia	+	+	+	-	-									
		Decrease of locomotor activity	-	-	-	+	+									
	1402		-	-	-	-	-									
	1403	Decrease of locomotor activity	-	-	-	+	+									
	1404		-	-	-	-	-									
	1405		-	-	-	-	-									
-: No observable abnormality, +: observable abnormality																
Group(Male)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	1101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 1,250	1201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1205		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 2,500	1301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1302		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1303		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1304		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1305		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 5,000	1401		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1402	Decrease of locomotor activity	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease of food consumption	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1403		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1404		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1405		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-: No observable abnormality, +: observable abnormality																

Group(Female)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Hours													
			0.5	1	2	3	4									
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-								
	2102		-	-	-	-	-	-								
	2103		-	-	-	-	-	-								
	2104		-	-	-	-	-	-								
	2105		-	-	-	-	-	-								
G2 1,250	2201		-	-	-	-	-	-								
	2202		-	-	-	-	-	-								
	2203		-	-	-	-	-	-								
	2204		-	-	-	-	-	-								
	2205		-	-	-	-	-	-								
G3 2,500	2301		-	-	-	-	-	-								
	2302		-	-	-	-	-	-								
	2303		-	-	-	-	-	-								
	2304		-	-	-	-	-	-								
	2305		-	-	-	-	-	-								
G4 5,000	2401	Decrease of locomotor activity	-	-	-	-	+	+								
	2402		-	-	-	-	-	-								
	2403	Decrease of locomotor activity	+	+	-	-	-	-								
	2404	Decrease of locomotor activity	-	-	-	-	+	+								
	2405	Decrease of locomotor activity	-	-	-	-	+	+								
-: No observable abnormality, +: observable abnormality																
Group(Female)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Day													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
G1 0	2101		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2102		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2103		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2104		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2105		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G2 1,250	2201		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2202		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2203		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2204		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2205		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G3 2,500	2301		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2302		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2303		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2304		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2305		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 5,000	2401		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2402		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2403		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2404	Decrease of locomotor activity	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2405		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
-: No observable abnormality, +: observable abnormality																

Table 6. Necropsy finding

Group(Female)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy Findings	Fate
G1 0	2101		No abnormality detected	Sacrifice
	2102		No abnormality detected	Sacrifice
	2103		No abnormality detected	Sacrifice
	2104		No abnormality detected	Sacrifice
	2105		No abnormality detected	Sacrifice
G2 1,250	2201		No abnormality detected	Sacrifice
	2202		No abnormality detected	Sacrifice
	2203		No abnormality detected	Sacrifice
	2204		No abnormality detected	Sacrifice
	2205		No abnormality detected	Sacrifice
G3 2,500	2301		No abnormality detected	Sacrifice
	2302		No abnormality detected	Sacrifice
	2303		No abnormality detected	Sacrifice
	2304		No abnormality detected	Sacrifice
	2305		No abnormality detected	Sacrifice
G4 5,000	2401		No abnormality detected	Sacrifice
	2402		No abnormality detected	Sacrifice
	2403		No abnormality detected	Sacrifice
	2404		No abnormality detected	Sacrifice
	2405		No abnormality detected	Sacrifice
Group(Male)/Dose(mg/kg)	Animal ID	Organ	Necropsy Findings	Fate
G1 0	1101		No abnormality detected	Sacrifice
	1102		No abnormality detected	Sacrifice
	1103		No abnormality detected	Sacrifice
	1104		No abnormality detected	Sacrifice
	1105		No abnormality detected	Sacrifice
G2 1,250	1201		No abnormality detected	Sacrifice
	1202		No abnormality detected	Sacrifice
	1203		No abnormality detected	Sacrifice
	1204		No abnormality detected	Sacrifice
	1205		No abnormality detected	Sacrifice
G3 2,500	1301		No abnormality detected	Sacrifice
	1302		No abnormality detected	Sacrifice
	1303		No abnormality detected	Sacrifice
	1304		No abnormality detected	Sacrifice
	1305		No abnormality detected	Sacrifice
G4 5,000	1401		No abnormality detected	Sacrifice
	1402		No abnormality detected	Sacrifice
	1403		No abnormality detected	Sacrifice
	1404		No abnormality detected	Sacrifice
	1405		No abnormality detected	Sacrifice

후 기

본 연구는 해양수산부 국가R&D사업“해수추출 미네랄 활용 글로벌 건강기능식품 개발 및 수출(PMS4560)”과“해양심층수 활용 다단계 복합양식 기술개발(PES4340)”에 의해 수행된 연구 결과입니다.

References

- [1] Ha, B.G., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Magnesium and calcium-enriched deep-sea water promotes mitochondrial biogenesis by AMPK-activated signals pathway in 3T3-L1 preadipocytes, BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY, 83(1), 477-484.
- [2] Ham, J.Y. and Shon, Y.H., 2020, Natural Magnesium-Enriched

- Deep-Sea Water Improves Insulin Resistance and the Lipid Profile of Prediabetic Adults: A Randomized, Double-Blinded Cross-over Trial, *Nutrients*, 12(2), 515-529.
- [3] Ji, H., Kim, K.S., Moon, D.S., Kim, H.J., and Lee, H.S, 2015, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 18(1), 9-14.
- [4] Ji, H., Moon, D.S., Choi, M.Y., Kim, K.S., Lee, H.S. and Kim, H.J., 2014, Production of High Hardness Concentrated Seawater Using NF Membrane, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 17(4), 333-337.
- [5] Lee, K.S., Kwon, Y.S., Kim, S.Y., Moon, D.S., Kim, H.J. and Shon, Y.H., 2016, Regulatory mechanism of mineral-balanced deep sea water on, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 86(1), 405-413.
- [6] Moon, D.S., Jung, D.H., Kim, H.J. and Shin, P.K., 2004, Features of deep ocean water and underground salt water, *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Energy*, 7(1), 42-46.
- [7] National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS), 2019, *KNTP Toxicity Test Manual*.

Received 13 July 2020

Revised 26 August 2020

Accepted 1 September 2020