

CONFIDENTIAL

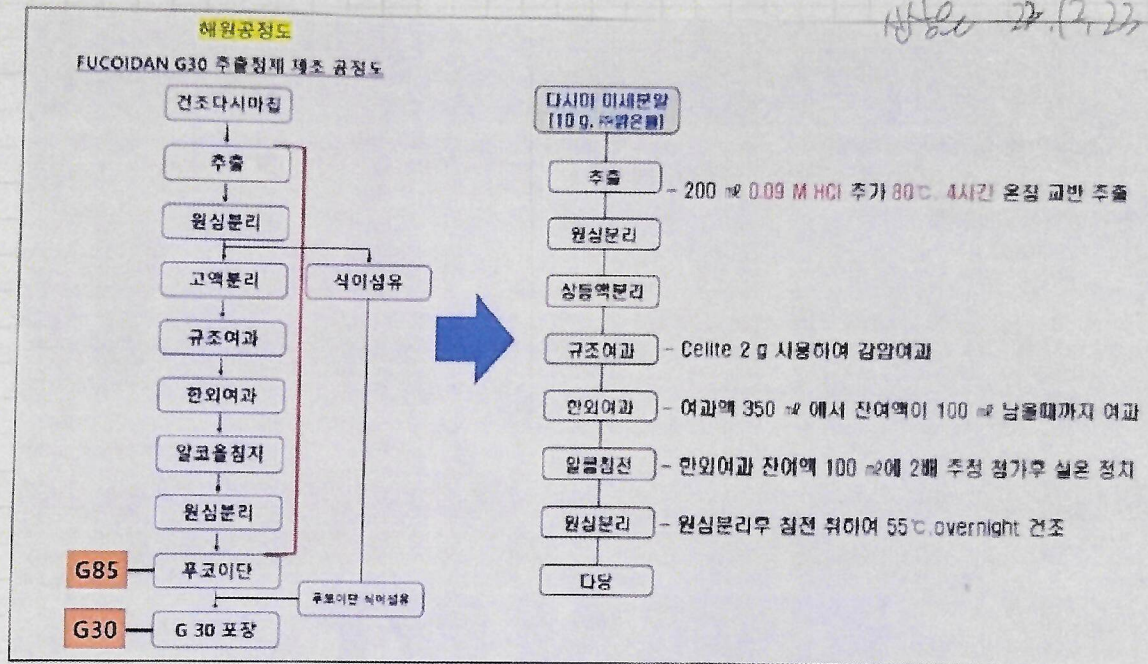
Project Code

Title 다시마 유래 (다당) Fucoidan 분획 개발 연구

From Page No.

Subject : 후코이단 분획을 다당 추출물에서 분리 추출 최적화 조건 설정 실험

실험일지 22.12.23



해원의 공정도 향하여 최적화 조건을 잡아나감.

To Page No.

Witnessed by

Sign.

김민

Date.

Recorded by

Sign.

김민

Date.

22.12.23

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

Subject : • 농축액의 brix 에 따른 활성 비교

- 재사 생산 현장에서 다당침전 가지 실험 2번째 원료의 활성 측정
(다당침전 생성 후 100 mesh 에 걸러진 침전과 통과한 침전 사이의
활성 차이 비교)
- 새로운 양식의 대사 분해를 이용하여 제조한 대사마 농액의
활성 비교

Materials

신상호 22.12.23

시료 코드	제조 방법	송부량 (mg)
1 시4-PS1	맑은물 다시마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press), 농축 후 (9.4 brix) 연구소에서 소량을 이용해 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	109.7 mg
2 시4-PS2	맑은물 다시마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press), 농축 후 (10.2 brix) 연구소에서 소량을 이용해 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	102.3 mg
3 시4-PS3	맑은물 다시마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press), 농축 후 (14.8 brix) 연구소에서 소량을 이용해 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	101.7 mg
4 시4-PS4	맑은물 다시마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press) 하였고, 1.5 배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	166.0 mg
5 시4-PS4-침전	맑은물 다시마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press) 하였고, 1.5 배 주정 가해 다당침전 유도 후 100 mesh로 여과시 통과한 침전을 여과 건조 분쇄한 분말	121.0 mg
6 인그린 1-PS	인그린 다시마분말(살균 전)을 원물 대비 증류수 1:20 (5%) 비율로 연구소에서 4시간 추출, 원심분리, 균조여 과하였고, 농축후 (6 brix), 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	106.0 mg
7 인그린 2-PS	인그린 다시마분말(살균 전)을 원물 대비 증류수 1:10 (10%) 비율로 연구소에서 4시간 추출, 원심분리, 균조여 과하였고, 농축후 (6 brix), 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말	109.6 mg
8 세인-G30-2	세인 G30분말을 5%농도로 용해시켜 투석을 통해 염분을 제거하고, 최대한 농축후 초자력면을 끌어내어 분말 양을 이를 트레이에 건조후 분쇄한 분말	115.0 mg

배원의 'G60'을 대조군으로 사용함.

* 모든 시료는 1mB/ml 이 되도록 media에 용해시킨 후 (30°C, 25 min) 0.45 µm 필터로 filter 되어 사용된다.

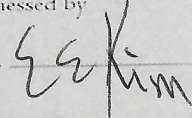
1) ELISA stop solution (2N H₂SO₄) Inuitrogen, Cat no. SSC4

2) mTNF-α ELISA kit (Inuitrogen, REF 88-7324-88)

3) mIL-6 ELISA kit (Inuitrogen, REF 88-7064-88)

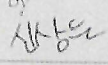
To Page No. _____

Witnessed by

Sign. 

Date. _____

Recorded by

Sign. 

Date. 22.12.23

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

Exp. Methods : ① Raw 264.7 세포를 2.5×10^5 cell/ml에 48 well plate에 250μl씩 seeding → overnight.

② 상동액 제거 후 완전 배지 225 μl 넣고 세포 25 μl를 처리함.

③ 세포 처리 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양함.
세포 상동액을 얻음.

④ coating buffer에 capture antibody를 immune 96-well plate에 coating 한 후 4°C, overnight.

⑤ coating이 완료된 microplate는 washing buffer (PBS with 0.05% tween 20, PBST)를 이용하여 3회 세척

⑥ assay diluent (diluent buffer) 200 μl을 분포한 뒤, 1시간 동안 방치하여 항체가 붙지 않는 표면을 blocking 함.
well

⑦ washing buffer를 이용하여 3회 세척

⑧ 연속 클로날 표지물질 (recombinant mouse 사이토카인)과 면역세포 배양액을 각각 100 μl씩 분포하여 RT 2시간.

⑨ washing buffer를 이용하여 5회 세척

⑩ detection antibody (in assay diluent) 100 μl를 처리하여 RT 1시간

⑪ washing buffer를 이용하여 5회 세척

⑫ Enzyme reagent 100 μl를 처리하여 RT 30분.

⑬ washing buffer를 이용하여 5회 세척

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. 김민

Date. _____

Recorded by

Sign. 신상원Date. 22.12.23

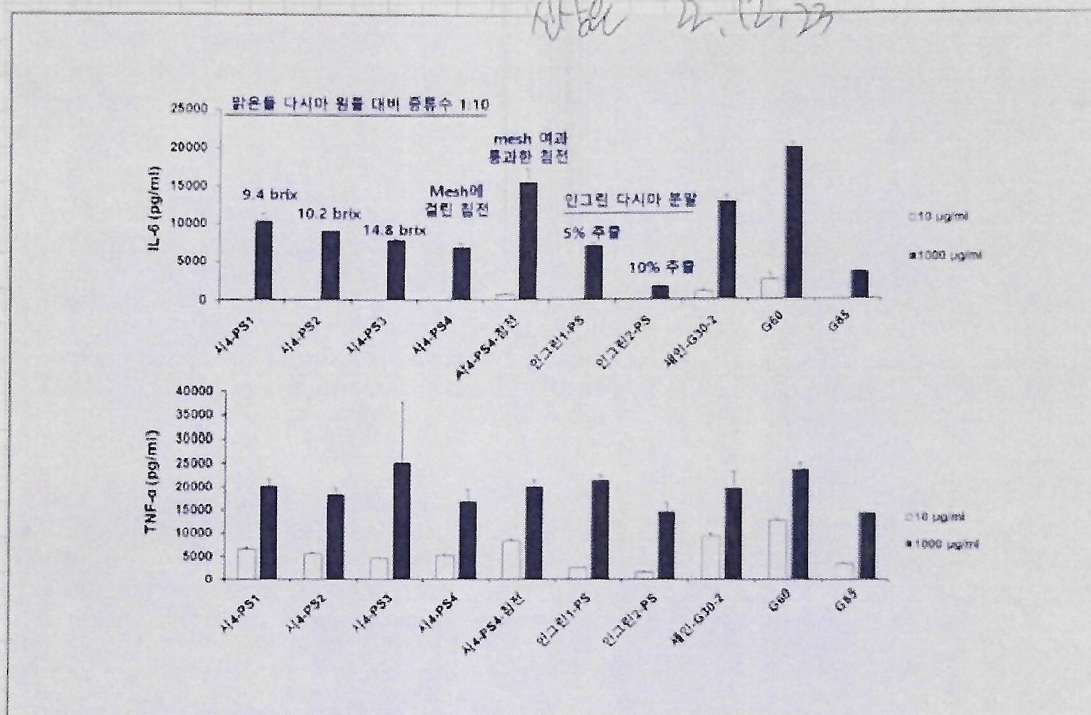
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

- (14) substrate solution 100 μ l 을 가하여 양실에서 30분간 반응
 → 50 μ l 의 stop solution (2N H_2SO_4) 첨가.
- (15) Microplate reader로 450 nm 로 측정.

Results



* brix : 시4-PS1 (9.4) > 시4-PS2 (10.2) > 시4-PS3 (14.8)임
 그러나 면역활성에 큰 차이는 없음.

* 대량침전 생장 후 100 mesh 로 여과 시 통과한 침전 (시4-PS4-침전)이
 mesh 에 걸린 침전 (시4-PS4) 보다 면역 활성이 높음.

* 침출 : 인그린 1-PS (5%) 이 인그린 2-PS (10%) 보다 면역 활성이 높음.

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. 김기현

Date. _____

Recorded by _____

Sign. 신상호Date. 22.12.23

Project Code _____

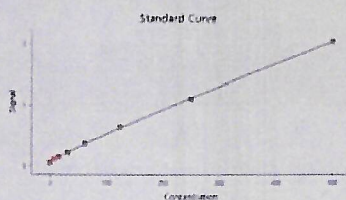
Title _____

From Page No. _____

Raw data

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	2.051
Std0002	250.0	1.106
Std0003	125.0	0.6410
Std0004	62.50	0.3624
Std0005	31.20	0.2200
Std0006	15.60	0.1444
Std0007	7.800	0.1133
Std0008	0	0.05776



H/Se 22.12.23

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

Where:

$$a = 0.062025$$

$$b = 0.907419$$

$$c = 1.72E+09$$

$$d = 1.695910$$

$$R^2: 0.999$$

$$y = 1.69591E+06 + (0.062025 - 1.69591E+06) / (1 + (x/1.72097E+09)^{0.907419})$$

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.05971	0.06026		< Min	< Min		0	0.0	0.0	0.00	0.00
	LPS	1.100	1.253		244.8	284.8		19584	22784		21184.00	2262.74
1	시4-PS1-10	0.4622						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	시4-PS1-1000	0.9128	1.013		196.5	222.2		9825	11110		10467.50	908.63
2	시4-PS2-10	0.3159						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	시4-PS2-1000	1.878	2.106	1.881	453.2	> Max	454.1	9064		9082	9073.00	12.73
3	시4-PS3-10	0.1772						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	시4-PS3-1000	1.622	1.637	1.634	383.4	401.1	386.7	7668	8022	7734	7808.00	188.24
4	시4-PS4-10	0.3177						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	시4-PS4-1000	1.347	1.480	1.571	309.5	345.0	369.7	6190	6900	7394	6828.00	605.22
5	시4-PS4-질전-10	0.4455	0.4175		81.68	75.13		816.8	751.3		784.05	46.32
	시4-PS4-질전-1000	1.258	1.440		286.0	334.5		14300	16725		15512.50	1714.73
6	인그린1-PS-10	0.06827						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	인그린1-PS-1000	1.454	1.561	1.541	338.1	366.8	361.4	6762	7336	7228	7108.67	305.04
7	인그린2-PS-10	0.06566						0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
	인그린2-PS-1000	0.4954	0.4995	0.4855	93.45	94.43	91.10	1869	1880.6	1822	1859.37	34.23
8	세인-G30-2-10	0.5562	0.6362		108.0	127.4		1080.0	1274.0		1177.00	137.18
	세인-G30-2-1000	1.102	1.192		245.2	268.7		12290	13435		12847.50	830.85
9	G60-10	0.8018	0.6043	0.5460	168.5	119.6	105.5	3370	2392	2110	2624.00	561.26
	G60-1000	1.140	1.136	1.084	255.0	254.0	240.5	20400	20320	19240	19986.67	647.87
10	G85-10	0.08956	0.09082	0.09490	4.483	4.708	5.449	4.483	4.708	5.449	4.88	0.31
	G85-1000	0.8381	0.8495	0.8223	177.6	180.5	173.6	3552	3610	3472	3544.67	69.29

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. _____

Date. _____

Recorded by _____

Sign. _____

Date. _____

22.12.23

Project Code _____

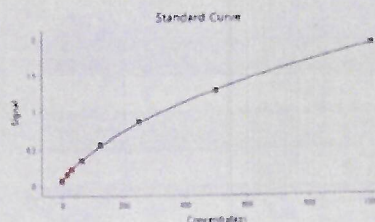
Title _____

From Page No. _____

Raw data

TNF- α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.925
Std0002	500.0	1.284
Std0003	250.0	0.8492
Std0004	125.0	0.5538
Std0005	62.50	0.3420
Std0006	31.20	0.2185
Std0007	15.60	0.1418
Std0008	0	0.06145



Date 22.12.23

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

Where:

$$a = 0.0518195$$

$$b = 0.780284$$

$$c = 2946.27$$

$$d = 6.26546$$

$$R^2: 0.999$$

$$y = 6.26546 + ((0.0518195 - 6.26546) / (1 + (x/2946.27)^{0.780284}))$$

Sample		O.D		Conc			*Dilution factor			Average	SD	SD
	Normal	0.3167	0.2798	0.3897	54.64	44.70	75.81	54.64	44.70	75.81	58.38	15.89
	LPS	0.9476	1.003		300.6	328.7		24048	26296		25172.00	1589.58
1	시4-PS1-10	1.589	1.513	1.520	708.0	650.0	654.7	7080.0	6500.0	6547.0	6709.00	322.15
	시4-PS1-1000	1.198	1.123	1.107	438.8	394.7	385.6	21940.0	19735.0	19280.0	20318.33	1422.71
2	시4-PS2-10	1.408	1.410	1.341	574.2	575.5	528.8	5742.0	5755.0	5288.0	5595.00	265.95
	시4-PS2-1000	1.131	1.071	1.020	398.9	365.5	338.1	19945.0	18275.0	16905.0	18375.00	1522.47
3	시4-PS3-10	1.259	1.249	1.228	476.1	469.7	456.6	4761.0	4697.0	4566.0	4674.67	98.40
	시4-PS3-1000	1.553	0.9960	0.07586	679.9	325.3		33995.0	16265.0		25130.00	12537.00
4	시4-PS4-10	1.370	1.320	1.336	548.5	515.3	525.5	5485.0	5153.0	5255.0	5297.67	170.06
	시4-PS4-1000	1.123	0.9784	0.9567	354.8	316.2	305.1	19740.0	15810.0	15255.0	16935.00	2445.00
5	시4-PS4-침전-10	1.785	1.746	1.735	671.8	837.7	828.7	8718.0	8377.0	8287.0	8460.67	227.36
	시4-PS4-침전-1000	1.162	1.163	1.070	416.9	417.9	365.0	20645.0	20695.0	18250.0	19996.67	1512.86
6	인그린1-PS-10	0.8663	0.8610	0.8547	260.9	258.4	255.5	2609.0	2584.0	2555.0	2582.67	27.02
	인그린1-PS-1000	1.161	1.221	1.156	416.8	452.1	413.9	20840.0	22605.0	20695.0	21380.00	1063.36
7	인그린2-PS-10	0.6077	0.6429	0.6344	150.6	164.3	168.8	1506.0	1643.0	1688.0	1612.33	94.80
	인그린2-PS-1000	0.9892	0.9612	0.8284	321.8	307.4	243.3	16090.0	15370.0	12165.0	14541.67	2089.50
8	세인-G30-2-10	1.917	1.647	1.618	985.9	928.6	902.5	9959.0	9286.0	9025.0	9423.33	481.91
	세인-G30-2-1000	1.258	1.071	1.020	475.4	365.3	337.9	23770.0	18265.0	16895.0	19643.33	3638.85
9	G60-10	1.531	1.493	1.456	663.7	635.4	608.0	13274.0	12708.0	12160.0	12714.00	557.02
	G60-1000	1.301	1.238	1.231	503.0	463.0	458.4	25150.0	23150.0	22920.0	23740.00	1226.50
10	G85-10	1.001	1.021	1.109	327.7	338.4	386.7	3277.0	3384.0	3867.0	3509.33	314.33
	G85-1000	1.601	1.605	1.598	717.3	720.8	715.0	14346	14416	14300	14354.00	58.41

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

E. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

J. Kim

Date. _____

22.12.23

Project Code _____

Title 다사마 원말 (다당) Fucaran 골동 개발 연구

From Page No. _____

Subject : • 후코란 F 라트형 활성 비교

• 골동 추출시 활성의 변화가 발생하는지 확인

Materials :

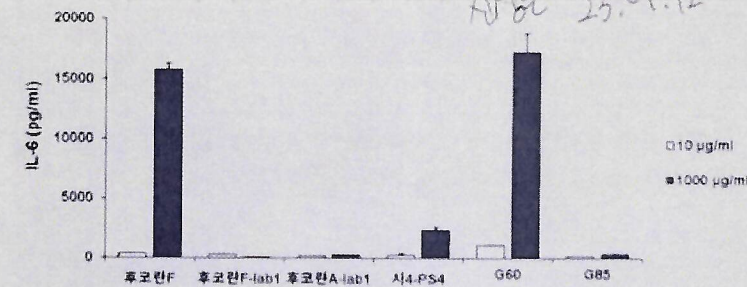
신상영 23.01.12

시료 코드	제조 방법
1 후코란 F-lab1	맑은물 다사마 분말을 연구소에서 추출(120°C, 4h), 여과 (부직포 2매) 후 나온 잔사를 건조, 분쇄 분말
2 후코란 A-lab1	맑은물 다사마 분말을 연구소에서 추출(120°C, 4h), 여과 (부직포 2매) 후 나온 추출액(9.5 brix)을 1:1.5비율로 주정 침전 하여 원심분리로 침전 회수 후 건조, 분쇄한 분말
3 시4-PS4	맑은물 다사마분말을 원물 대비 증류수 1 : 10 비율로 2층 현장에서 10시간 추출, 여과(압축 press) 하였고, 1.5배 주정 가해 생성된 다당침전을 여과 건조 분쇄한 분말

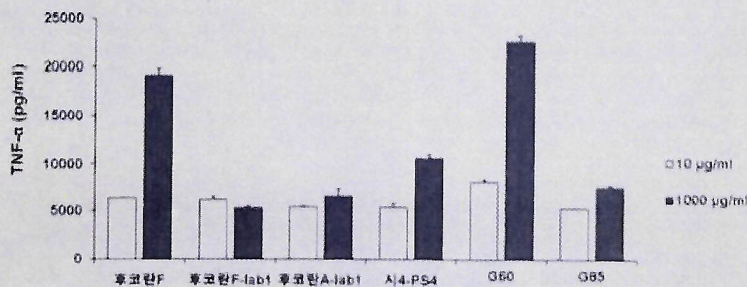
Exp. Methods : P.3 과 동일

Results

신상영 23.01.12



이 기준 시상한된 후코란 F보다
후코란 F-lab1 이 활성이
낮음 (시상한 쿼터별 활성비교)



• 후코란 A-lab1과
시4-PS4 활성비교시 후코란
A-lab1 이 활성이 낮음.
골동 추출시 그해 활성이
감소하는 것으로 시료됨.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. *Sh Kim*

Date. _____

Recorded by

Sign. *신상영*

Date. 23.01.12

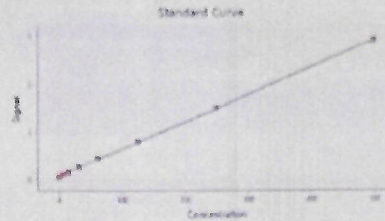
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	2.902
Std0002	250.0	1.528
Std0003	125.0	0.8126
Std0004	62.50	0.4833
Std0005	31.20	0.2785
Std0006	15.60	0.1685
Std0007	7.800	0.1120
Std0008	0	0.06020



$$y = 0.00596481x + 0.0880575$$

$$y = ax + b$$

Where:

$$a = 0.00596481$$

$$b = 0.0880575$$

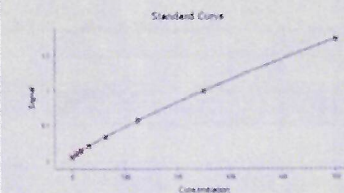
$$R^2: 0.999$$

HHC 23.01.12

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.32260	0.0639		41.41000	< Min						
	LPS	0.8255	0.6460	0.6390	130.2	98.5	97.3	10416	7879.2	7780	8691.73	1494.08226
1	후코판F-lab1-10	1.2860	1.3920	1.0320	211.5	230.1	166.7	211.5	230.1	166.7	202.77	32.5897734
	후코판F-lab1-1000	0.0759	0.0705	0.0722	< Min	< Min	< Min					
2	후코판A-lab1-10	1.0460	0.9565	0.7513	169.2	153.3	117.1	169.2	153.3	117.1	146.33	26.7009887
	후코판A-lab1-1000	0.1024	0.0985	0.0911	2.5	1.8	0.5	50.6	36.8	10.7	32.71	20.2730042
3	후코판F-10	1.72900	1.47000	1.35600	289.600	244.000	223.900	289.600	244.000	223.900	252.50	33.0646699
	후코판F-1000	2.1500	2.0970	2.2530	364.00	354.70	382.10	7280.0	7094.0	7642.0	7338.67	278.670654
4	시4-PS4-10	1.9500	0.9193	0.6904	328.7	146.7	106.3	328.7	146.7	106.3	193.90	118.474976
	시4-PS4-1000	0.4397	0.4897	0.4831	62.1	70.9	69.7	1241.6	1418.0	1394.8	1351.47	95.8518301
5	G60-10	0.8383	0.8728	0.6722	132.4	138.5	103.1	662.0	692.5	515.5	623.33	94.6233763
	G60-1000	0.9532	1.0550	0.9854	152.7	170.7	158.4	7635.0	8535.0	7920.0	8030.00	459.972525
6	G85-10	0.7345	0.6688	0.8971	114.1	102.5	142.8	114.1	102.5	142.8	119.80	20.745843
	G85-1000	0.1790	0.1694	0.1858	16.1	14.4	17.3	160.5	143.7	172.8	158.93	14.5135589

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	1.740
Std0002	250.0	0.9913
Std0003	125.0	0.5806
Std0004	62.50	0.3233
Std0005	31.20	0.1974
Std0006	16.50	0.1304
Std0007	7.800	0.09885
Std0008	0	0.05689



Where:

$$a = 0.0576466$$

$$b = 0.947624$$

$$c = 3503.91$$

$$d = 12.3897$$

$$R^2: 0.999$$

$$y = 12.3897 + ((0.0576466 - 12.3897) / (1 + (x/3503.91)^{0.947624}))$$

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.23490	0.2409	0.23490	41.84000	43.64	41.85	41.84000	43.64	41.85	42.44	1.03635579
	LPS	0.7413	0.8294	1.3680	192.0	218.1	377.7	15360	17448	30216	21008.00	8042.41158
1	후코판F-lab1-10	0.5663	0.6031	0.4291	140.1	151.0	99.4	280.2	302.0	198.8	260.35	54.3701438
	후코판F-lab1-1000	0.1985	0.2192	0.2246	31.1	37.2	38.8	62.1	74.4	77.6	71.38	8.17549998
2	후코판A-lab1-10	0.4113	0.4007	0.3329	94.2	91.0	70.9	188.3	182.0	141.3	170.99	25.2370389
	후코판A-lab1-1000	0.5219	0.4652	0.4794	126.9	110.1	114.3	253.8	220.2	228.6	234.20	17.4859644
3	후코판F-10	0.74080	0.64080	0.61580	191.800	162.200	155.700	383.6	324.4	311.4	339.80	38.4848022
	후코판F-1000	1.8810	1.9880	1.8490	> Max	> Max	> Max				15812.1	600.43173
4	시4-PS4-10	0.8181	0.4077	0.2984	214.8	93.1	60.7	429.6	186.1	121.3	245.69	162.537669
	시4-PS4-1000	0.8019	0.9659	0.9424	210.0	258.6	251.6	2100.0	2586.0	2516.0	2400.67	262.726727
5	G60-10	0.7733	0.8749	0.7807	201.5	231.6	203.7	1007.5	1158.0	1018.5	1061.33	83.8962653
	G60-1000	1.3370	1.1390	1.3060	368.7	310.0	359.4	18485.0	15500.0	17970.0	17301.67	1577.51851
6	G85-10	0.3006	0.3202	0.3760	61.3	67.1	83.7	122.6	134.3	167.4	141.43	23.2119481
	G85-1000	0.3315	0.3185	0.3705	70.5	66.6	82.1	352.5	333.2	410.3	365.30	40.1121241

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

Recorded by _____

Sign. _____

HHC

Date. _____

23.01.12

CONFIDENTIAL

9

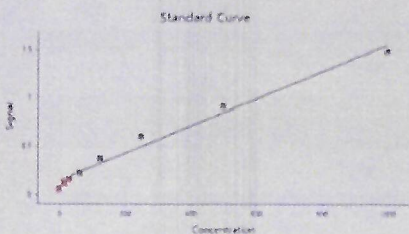
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

TNF- α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.476
Std0002	500.0	0.9067
Std0003	250.0	0.5923
Std0004	125.0	0.3625
Std0005	62.50	0.2128
Std0006	31.20	0.1480
Std0007	15.60	0.1064
Std0008	0	0.05391



$$y = 0.00140973x + 0.132894$$

$$y = ax + b$$

Where:

$$a = \text{*****}$$

$$b = 0.132894$$

$$R^2 = 0.980$$

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	1.93900	2.0050	1.84000	> Max	> Max	> Max					
	LPS	0.5708	0.5344	0.5420	310.7	284.8	290.2	24856	22784	23216	23618.67	1093.1154
1	후코란F-lab1-10	1.0580	0.9978	0.9504	656.0	613.6	579.9	6560.0	6136.0	5799.0	6165.00	381.32794
	후코란F-lab1-1000	0.5130	0.4969	0.5231	289.6	258.2	276.8	5392	5164	5536	5364.00	187.57399
2	후코란A-lab1-10	0.8953	0.9226	0.8820	540.8	560.2	531.4	5408.0	5602.0	5314.0	5441.33	146.86502
	후코란A-lab1-1000	0.5794	0.5593	0.6606	316.7	302.4	374.3	6334	6048	7486	6622.67	761.22095
3	후코란F-10	1.03500	1.02400	1.01100	639.300	632.400	622.900	6399.0	6324.0	6229.0	6317.33	85.195853
	후코란F-1000	0.6664	0.6594	0.6951	378.40	373.50	398.80	18920.0	18675.0	19940.0	19178.33	670.90114
4	시4-PS4-10	0.9728	0.8543	0.8735	595.8	511.7	525.3	5958.0	5117.0	5253.0	5442.67	451.4425
	시4-PS4-1000	0.4215	0.4366	0.4430	204.7	215.4	220.0	10235.0	10770.0	11000.0	10668.33	392.50265
5	G60-10	0.7285	0.6950	0.7027	422.5	398.7	404.2	8450.0	7974.0	8084.0	8169.33	249.20942
	G60-1000	0.7598	0.7921	0.7644	444.7	467.6	448.0	22235.0	23380.0	22400.0	22671.67	618.95746
6	G85-10	0.8906	0.8800	0.8831	537.5	530.0	532.2	5375.0	5300.0	5322.0	5332.33	38.552994
	G85-1000	0.6555	0.6879	0.6583	370.7	393.7	372.7	7414.0	7874.0	7454.0	7580.67	254.8202

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

23.01.12

Project Code _____

Title 다시마 유래 (다당) Curcumin 골통 제발 연구

From Page No. _____

Subject : 주정 침전시 에탄올과 농축액·주정의 함량에 따른 활성 비교

• 후코란 F, 후코란 A, 시6-PS 의 실험에 의한 영역 활성 확인.

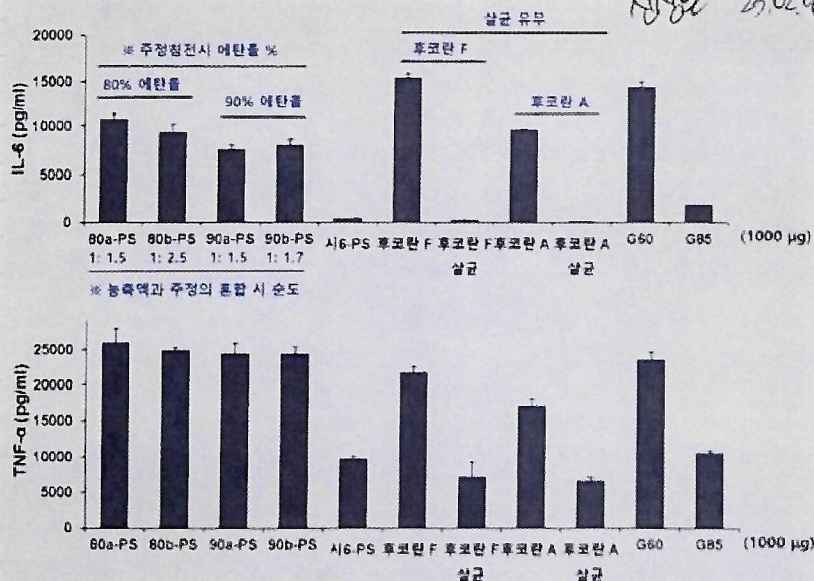
Materials :

신상원 23.02.08
제조 방법

	시료 코드	제조 방법
1	80a-PS	맑은들 다시마 분말을 이용하여 연구소에서 추출, 여과(원심분리 + 부직포) 및 주정침전 진행/ 주정침전시 80% 에탄올로 1:1.5비를 침전 유도하여 건조 분쇄한 분말
2	80b-PS	맑은들 다시마 분말을 이용하여 연구소에서 추출, 여과(원심분리 + 부직포) 및 주정침전 진행/ 주정침전시 80% 에탄올로 1:2.5비를 침전 유도하여 건조 분쇄한 분말
3	90a-PS	맑은들 다시마 분말을 이용하여 연구소에서 추출, 여과(원심분리 + 부직포) 및 주정침전 진행/ 주정침전시 90% 에탄올로 1:1.5비를 침전 유도하여 건조 분쇄한 분말
4	90b-PS	맑은들 다시마 분말을 이용하여 연구소에서 추출, 여과(원심분리 + 부직포) 및 주정침전 진행/ 주정침전시 90% 에탄올로 1:1.7비를 침전 유도하여 건조 분쇄한 분말
5	시6-PS	생산현장에서 맑은들 다시마 분말 추출액을 순간살균기에 통과시킨 뒤 여과하여 나온 여과액을 연구소에서 농축, 주정침전, 건조 분쇄한 분말

Exp. Methods : page 3-4 약 동일

Results



• 주정 침전시 80% 에탄올이 90% 에탄올 보다 활성이 줄거나 큰 차는 없음.

• 농축액과 주정의 함량 시 순도 차이에 따른 활성 차이는 없음.

• 후코란 F, 후코란 A 의 실험 차이에 의해 활성이 저하 됨.

• 시6-PS도 활성이 낮은 것으로 보아 실험에 의해 영역 활성이 저하되는 것으로 판단됨.

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. SK Kim

Date. _____

Recorded by _____

Sign. 신상원Date. 23.02.08

CONFIDENTIAL

11

Project Code

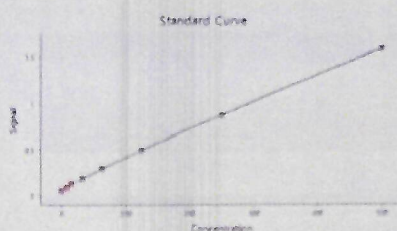
Title

Form Page No.

Raw data

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	1.588
Std0002	250.0	0.8759
Std0003	125.0	0.5017
Std0004	62.50	0.3001
Std0005	31.20	0.1917
Std0006	15.60	0.1281
Std0007	7.800	0.09120
Std0008	0	0.05425



Where:

a = 0.0570605

b = 0.890558

c = 2.947E+09

d = 1.635930

R²: 0.999

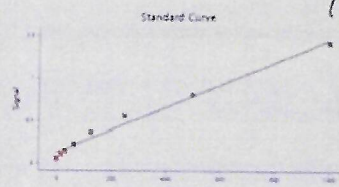
$$y = 1.63593E+06 + ((0.0570605 - 1.63593E+06) / (1 + (x/2.94742E+09)^{0.890558}))$$

$$y = d + ((a - d) / (1 + (x/c)^b))$$

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.05493	0.0652	0.05909	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	LPS	1.0330	1.1230	1.1450	310.0	339.8	346.9	24800	27184	27752	26578.67	1566.33
1	80a-PS-1000	0.7756	0.7394	0.6969	225.6	213.7	199.7	11280.0	10685.0	9985.0	10650.00	648.21
2	80b-PS-1000	0.5957	0.6572	0.7055	166.5	186.7	202.6	8325.0	9335.0	10130.0	9263.33	904.63
3	90a-PS-1000	0.5528	0.5125	0.5710	152.4	139.2	158.4	7620.0	6960.0	7920.0	7500.00	481.12
4	90b-PS-1000	0.5473	0.5625	0.6163	150.6	155.6	173.3	7530.0	7780.0	8665.0	7991.67	596.37
5	시6-PS-1000	0.18590	0.17710	0.17860	31.93000	29.03000	29.54000	319.3	290.3	295.4	301.67	15.48
6	후코란 F 실험-1000	0.1444	0.1438	0.1031	18.3100	18.1000	4.7500	183.1	181.0	47.5	137.20	77.69
7	후코란 F -1000	1.0280	0.9963	1.0580	308.4	298.1	318.4	15420.0	14905.0	15920.0	15415.00	507.52
8	후코란 A 실험-1000	0.0968	0.0924	0.0909	2.6650	1.2200	0.7141	26.7	12.2	7.1	15.33	10.12
9	후코란 A -1000	0.6723	0.6629	0.6824	191.6	188.6	195.0	9580.0	9430.0	9750.0	9586.67	160.10
10	G60-1000	0.9898	0.9871	0.9182	295.9	295.0	272.4	14795.0	14750.0	13620.0	14388.33	665.78
11	G85-1000	0.6519	0.6407	0.6388	184.9	181.3	180.7	1849.0	1813.0	1807.0	1823.00	22.72

TNF-α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.409
Std0002	500.0	0.8002
Std0003	250.0	0.5583
Std0004	125.0	0.3563
Std0005	62.50	0.2194
Std0006	31.20	0.1443
Std0007	15.60	0.1006
Std0008	0	0.05024



Where:

a = 0.00132

b = 0.127335

R²: 0.983

$$y = 0.00131996x + 0.127335$$

$$y = ax + b$$

	Sample	O.D			Conc			*Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.77540	1.0380	0.95930	491.00000	690.1000	630.30000	491.00000	690.1000	630.30000	603.80	102.16
	LPS	0.7019	0.6420	0.7221	435.3	389.9	450.6	34824	31192	36048	34021.33	2525.53
1	80a-PS-1000	0.8692	0.7555	0.8070	562.0	475.9	514.9	28100.0	23795.0	25745.0	25880.00	2155.67
2	80b-PS-1000	0.7847	0.7935	0.7688	498.0	504.7	486.0	24900.0	25235.0	24300.0	24811.67	473.72
3	90a-PS-1000	0.8092	0.7691	0.7260	516.6	486.2	453.5	23830.0	24310.0	22675.0	24271.67	1577.85
4	90b-PS-1000	0.7339	0.7696	0.7939	459.5	486.6	505.0	22975.0	24330.0	25250.0	24185.00	1144.41
5	시6-PS-1000	0.39160	0.36890	0.38370	200.200	183.000	194.200	10010.0	9150.0	9710.0	9623.33	436.50
6	후코란 F 실험-1000	0.2923	0.3124	0.3394	125.00	140.20	160.60	6250.0	7010.0	8030.0	7096.67	893.16
7	후코란 F -1000	0.7501	0.6374	0.7070	471.8	386.4	439.2	23590.0	19320.0	21960.0	21623.33	2154.82
8	후코란 A 실험-1000	0.3215	0.3051	0.2709	147.1	134.7	108.7	7355.0	6735.0	5435.0	6508.33	979.86
9	후코란 A -1000	0.5919	0.5648	0.5565	351.9	331.4	325.2	17595.0	16570.0	16260.0	16808.33	698.68
10	G60-1000	0.7781	0.7400	0.7206	493.0	464.2	449.5	24650.0	23210.0	22475.0	23445.00	1106.38
11	G85-1000	0.8065	0.7973	0.8485	514.6	507.5	546.4	10292.0	10150.0	10928.0	10456.67	414.32

To Page No.

Witnessed by

Sign.

S. Kim

Date.

Recorded by

Sign.

S. Kim

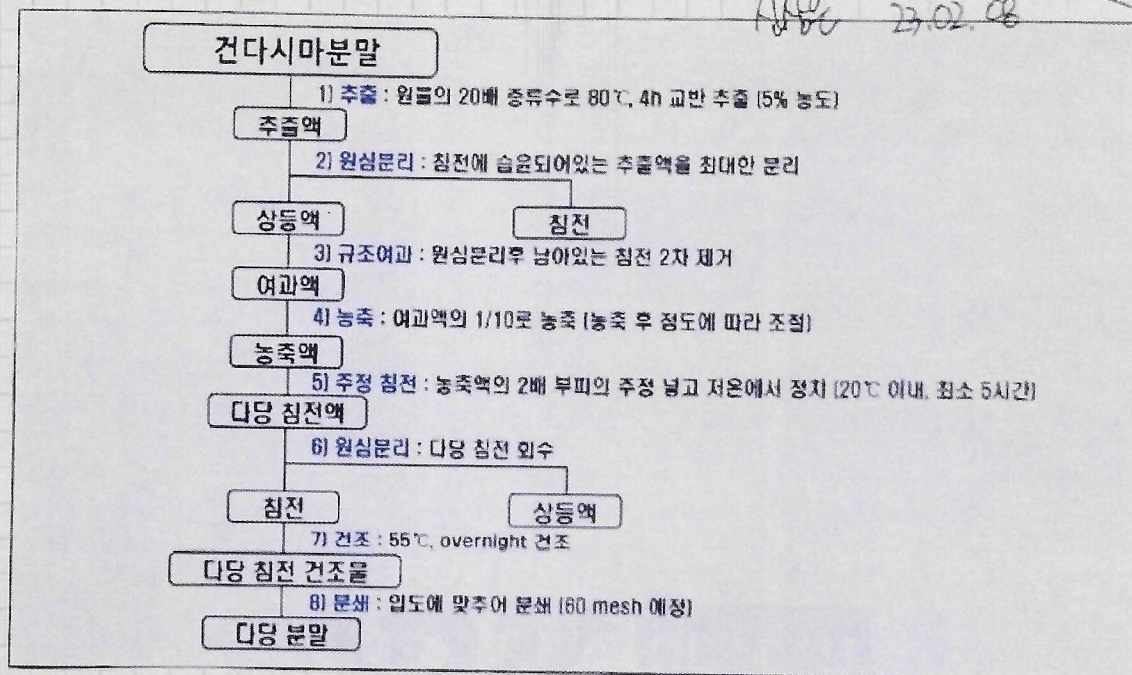
Date.

23.02.08

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____



생산 공정을 고려하여 생산 scale의 공정도가 될것임.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

G. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

신상원

Date. _____

23.02.08

Project Code _____

Title 대사 유래 (다당) Fucoran 용통 개발 연구

From Page No. _____

Subject: 세포생존율을 확인하기 위해 특정 활성 농도를 선정하고 일일치에 따른
시료의 활성을 비교함.

Material(s): 1) Fucoran (FC-1)

2) 배지용액 (F-PS, P-PS)

3) 다당 용액 (F-PS, P-PS)

→ 모든 시료는 1mg/ml 이 되도록 media 에 용해시킨 후
(37°C, 25 min) 0.45 μ m filter로 필터링하여 10, 30, 100 μ g/ml
농도로 제조함.

4) WST-8 cell viability Assay kit (BIO-MAX, Quanti-Max,
GM 10000)

5) ELISA stop solution (2N H_2SO_4) Invitrogen, Cat no. S544

6) mTNF- α ELISA kit (Invitrogen, REF 88-7324-88)

7) mIL-6 ELISA kit (Invitrogen, REF 88-7064-88)

<Cell viability>

Exp. Methods: ① Raw 264.7 세포를 1.5×10^5 cell/ml로 96-well Plate에 100 μ l 씩
seeding $\rightarrow$ overnight.

② 세포 처리 후 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양함.

③ WST-8 (CK-8) 시약 처리 2시간 후 microplate reader를
이용하여 450 nm 흡광도에서 측정.

④ Survival rate (%) = $\frac{(A_{sample} - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100$
 A_b = CK-8 만 처리 A_c = Cell Control) + CK-8

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. 김민

Date. _____

Recorded by

Sign. 신상민Date. 23.03.08

Project Code _____

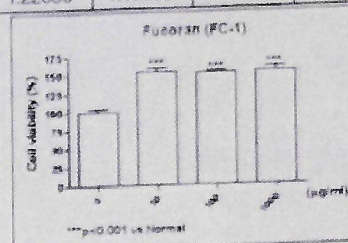
Title _____

From Page No. _____

Results:

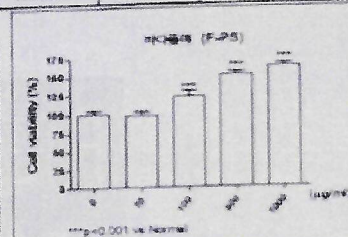
Fucoran (FC-1)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10µg/ml	1.4213	1.367	1.3197	1.3509		1.22808	1.17378	1.12548	1.15768	1.17150
100µg/ml	1.3705	1.365	1.3382	1.3333		1.17728	1.17178	1.14498	1.14008	1.15853
1000µg/ml	1.3005	1.4133	1.3633	1.3829		1.10728	1.22008	1.17008	1.18968	1.17178

Fucoran (FC-1)	Viability (%)				Average	SD
0	98.981904	105.66849	99.927748	95.421853	100.00	4.25
10µg/ml	161.32878	154.19554	147.98187	152.08053	153.90	5.59
100µg/ml	154.65533	153.93281	150.41216	149.76847	152.19	2.46
1000µg/ml	145.45962	160.27784	153.70948	156.28428	153.93	6.26



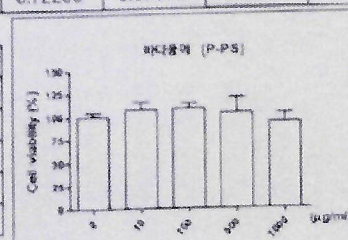
바다풀에 (F-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10µg/ml	1.3941	1.3588	1.2392	1.2837		1.20088	1.16558	1.04598	1.09048	1.12573
100µg/ml	1.2696	1.4354	1.3849	1.3589		1.07638	1.24218	1.19168	1.16568	1.16898
500µg/ml	0.9503	1.0684	1.1004	0.9136		0.75708	0.87518	0.90718	0.72038	0.81495
1000µg/ml	1.1092	1.3155	1.2498	1.2570		0.91598	1.12228	1.05658	1.06378	1.03965

바다풀에 (F-PS)	Viability (%)				Average	SD
0	98.981904	105.66849	99.927748	95.421853	100.00	4.25
10µg/ml	157.75559	153.11833	137.40681	143.25265	147.88	9.24
100µg/ml	141.40037	163.18106	156.54701	153.13147	153.56	9.12
500µg/ml	99.454826	114.96929	119.17304	94.63365	107.06	11.85
1000µg/ml	120.32907	147.43013	138.7993	139.74515	136.58	11.50



바다풀에 (P-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10µg/ml	1.0985	1.0137	0.9798	0.9609		0.90528	0.82048	0.78658	0.76768	0.82000
100µg/ml	1.0359	1.0709	0.9733	1.0108		0.84268	0.87768	0.78008	0.81758	0.82950
500µg/ml	0.8858	0.8869	1.0301	1.1357		0.69258	0.69368	0.83688	0.94248	0.79140
1000µg/ml	0.8583	0.9153	0.8639	1.0031		0.66508	0.72208	0.67068	0.80988	0.71693

바다풀에 (P-PS)	Viability (%)				Average	SD
0	98.981904	105.66849	99.927748	95.421853	100.00	4.25
10µg/ml	118.92345	107.78351	103.33016	100.84732	107.72	8.00
100µg/ml	110.69986	115.29771	102.47627	107.40254	108.97	5.41
500µg/ml	90.981641	91.126145	109.93793	123.81031	103.96	15.95
1000µg/ml	87.369043	94.856974	88.1047	106.39101	94.18	8.81



To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. _____

23.03.08
HJSC
HJSC

Date. _____

Recorded by _____

Sign. _____

HJSC

Date. _____

23.03.08

Project Code _____

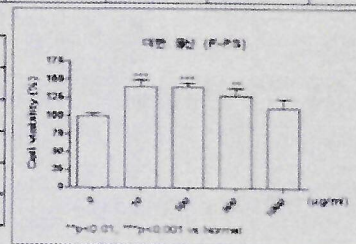
Title _____

From Page No. _____

대한물산 F-PS, P-PS 등 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성 없음.
F-PS의 경우 농도 의존적으로 세포가 증식하는 경향을 보임.

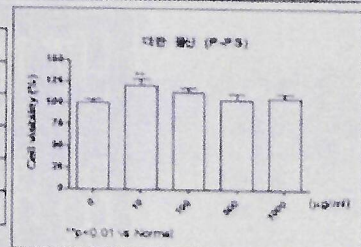
대한물산 (F-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10 $\mu\text{g/ml}$	1.1827	1.3463	1.2322	1.2830		0.98948	1.15308	1.03898	1.08978	1.06783
100 $\mu\text{g/ml}$	1.2286	1.3222	1.2587	1.2222		1.03538	1.12898	1.06548	1.02898	1.06470
500 $\mu\text{g/ml}$	1.0843	1.2723	1.1481	1.1632		0.89108	1.07908	0.95488	0.96998	0.97375
1000 $\mu\text{g/ml}$	1.1793	1.0011	1.0219	0.9527		0.98608	0.80788	0.82868	0.75948	0.84553

대한물산 (F-PS)	Viability (%)				Average	SD
0	98.981904	105.66849	99.927748	95.421853	100.00	4.25
10 $\mu\text{g/ml}$	129.98456	151.47624	136.48724	143.16069	140.28	9.20
100 $\mu\text{g/ml}$	136.01432	148.31029	139.96847	135.17357	139.87	6.00
500 $\mu\text{g/ml}$	117.05803	141.75507	125.43926	127.4229	127.92	10.26
1000 $\mu\text{g/ml}$	129.53792	106.12828	108.86072	99.770107	111.07	12.88



대한물산 (P-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10 $\mu\text{g/ml}$	1.1120	1.1598	1.1456	1.0364		0.91878	0.96658	0.95238	0.84318	0.92023
100 $\mu\text{g/ml}$	1.0754	1.0159	1.0107	1.0967		0.88218	0.82268	0.81748	0.90348	0.85645
500 $\mu\text{g/ml}$	0.9810	0.9527	0.9204	1.0599		0.78778	0.75948	0.72718	0.86668	0.78528
1000 $\mu\text{g/ml}$	0.9505	0.9684	1.0451	1.0056		0.75728	0.79518	0.85188	0.81238	0.80418

대한물산 (P-PS)	Viability (%)				Average	SD
0	98.981904	105.66849	99.927748	95.421853	100.00	4.25
10 $\mu\text{g/ml}$	120.6969	126.97626	125.11084	110.76554	120.89	7.24
100 $\mu\text{g/ml}$	115.88886	108.07251	107.38941	118.68698	112.51	5.64
500 $\mu\text{g/ml}$	103.4878	99.770107	95.526947	113.85267	103.16	7.84
1000 $\mu\text{g/ml}$	99.4811	104.45992	111.90844	106.71943	105.64	5.16



대한물산 P-PS, F-PS 등 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성 없음.
F-PS의 경우 세포가 증식하는 경향을 보임.

시상원 23.03.08

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. *S. Kim*

Date. _____

Recorded by _____

Sign. *시상원*

Date. _____

23.03.08

Project Code _____

Title _____

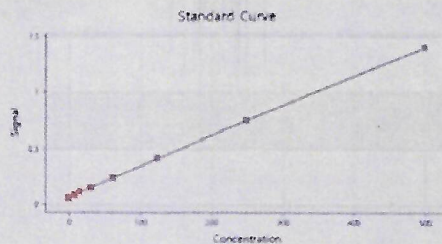
From Page No. _____

Exp. Methods

P.3 과 동일

Cytokine (IL-6)

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	1.336
Std0002	250.0	0.683
Std0003	125.0	0.3810
Std0004	62.50	0.2222
Std0005	31.20	0.1439
Std0006	15.60	0.1089
Std0007	7.800	0.0951
Std0008	0	0.06300



Where:
a = 0.0616157
b = 0.961667
c = 56192.6
d = 126.492
R² 0.999

$$y = 126.492 + ((0.0616157 - 126.492) / (1 + (x/56192.6)^{0.961667}))$$

$$y = d + ((a - d) / (1 + (x/c)^b))$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.06017	0.06131	0.05943	< Min	< Min	< Min	0.00	< Min	< Min	0.00	0.00
	LPS	1.1560	1.280	1.145	365.2	405.0	361.6	36520.00	40500.00	36160.00	37726.87	24.09
Fucoran (FC-1)	10	0.3531	0.3213	0.3177	100.3	89.5	88.2	100.30	89.45	88.21	92.65	6.65
	30	3.3360	3.2060	3.0060	> Max	> Max	> Max	> Max	> Max	> Max		
	100	2.7110	2.6240	2.8850	> Max	> Max	> Max					
바다풀에 (F-PS)	10	0.0779	0.0763	0.0769	3.1	2.5	2.7	3.09	2.46	2.70	2.75	0.32
	30	0.1025	0.1151	0.1278	12.4	17.1	21.7	12.42	17.06	21.72	17.07	4.65
	100	0.1841	0.2103	0.2217	41.6	51.1	55.0	125.49	153.18	165.12	147.93	6.78
바다풀에 (P-PS)	10	0.0606	0.0639	0.0682	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.0683	0.0663	0.0634	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	0.0613	0.0615	0.0599	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
대산물산 (F-PS)	10	0.0693	0.0910	0.0979	7.5	8.1	10.7	7.46	8.13	10.72	8.77	1.72
	30	1.6790	1.6460	1.2640	> Max	> Max	399.9	> Max	> Max	399.90	399.90	
	100	3.4970	3.4450	3.5050	> Max	> Max	> Max					
대산물산 (P-PS)	10	0.0751	0.0702	0.0632	2.0	< Min	< Min	1.97	0.00	0.00	0.66	
	30	0.1749	0.1639	0.1795	38.6	34.7	40.2	38.56	34.67	40.20	37.81	2.84
	100	0.9940	0.9114	1.0920	312.7	285.8	344.5	938.10	857.40	1033.50	943.00	29.35

이번 시료가 STD range 안에 들지 않아 재시험이 필요함.

시작일 23.03.08

To Page No.

Witnessed by

Sign. SS Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 시작일

Date. _____

23.03.08

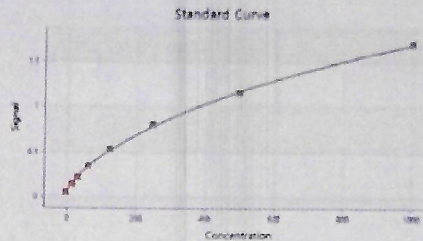
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

TNF-α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.695
Std0002	500.0	1.150
Std0003	250.0	0.8036
Std0004	125.0	0.5365
Std0005	62.50	0.3473
Std0006	31.20	0.2211
Std0007	16	0.1462
Std0008	0	0.05286



Where:

a = 0.04279

b = 0.709354

c = 3770.49

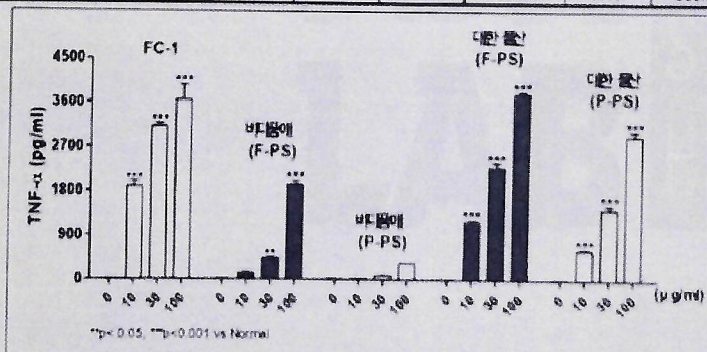
d = 5.90745

R²: 0.999

$$y = 5.90745 + ((0.04279 - 5.90745) / (1 + (x/3770.49)^{0.709354}))$$

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.1154	0.0965	0.1000	7.86	5.11	5.59	7.86	5.11	5.59	6.19	1.47
	LPS	0.7337	0.7528	0.6845	220.7	230.5	195.2	11035.00	11525.00	9810.00	10790.00	883.36
Fucoran (FC-1)	10	0.9909	0.9691	1.0390	370.5	356.3	402.8	1852.50	1781.50	2014.00	1882.67	119.15
	30	0.9049	0.8816	0.8982	316.1	302.2	312.1	3161.00	3022.00	3121.00	3101.33	71.56
	100	1.0360	0.9526	0.9515	400.7	345.7	345.0	4007.00	3457.00	3450.00	3638.00	319.58
바다풀에 (F-PS)	10	0.2239	0.1952	0.191	29.3	22.8	21.9	146.35	113.90	109.35	123.20	20.18
	30	0.2745	0.2759	0.2677	42.0	42.3	45.5	419.60	423.20	455.20	432.67	19.60
	100	0.6755	0.6927	0.6637	191.9	200.2	186.2	1919.00	2002.00	1862.00	1927.67	70.40
바다풀에 (P-PS)	10	0.0964	0.0976	0.0892	5.4	5.3	4.2	26.88	26.34	20.80	24.67	3.36
	30	0.1189	0.1171	0.1227	8.4	8.1	9.0	84.09	81.17	90.15	85.14	4.58
	100	0.2411	0.2470	0.2362	33.4	34.9	32.2	334.10	348.70	322.10	334.97	13.32
대한물산 (F-PS)	10	0.7976	0.7506	0.747	254.4	229.4	227.3	1272.00	1147.00	1136.50	1185.17	75.38
	30	0.7841	0.7548	0.7116	247.1	231.6	209.5	2471.00	2316.00	2095.00	2294.00	188.96
	100	1.0180	0.9929	0.9985	388.5	371.7	375.5	3885.00	3717.00	3755.00	3785.67	88.10
대한물산 (P-PS)	10	0.5168	0.4794	0.5357	122.4	108.0	130.0	612.00	540.00	650.00	600.67	55.87
	30	0.5469	0.5575	0.6056	134.6	139.0	159.7	1346.00	1390.00	1597.00	1444.33	134.03
	100	0.8790	0.8364	0.8664	300.7	277.1	305.0	3007.00	2771.00	3050.00	2942.67	150.21



바다풀에, 대한물산 등 시료 모두
P-PS 보다 F-PS가 TNF 생성
량이 높음. 특히, 대한물산 F-PS의
경우 FC-1과 비슷한 수준임.

신상민 23.03.08

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

SK Kim

Date. _____

Recorded by

Sign.

신상민

Date.

23.03.08

Project Code _____

Title 다시마 유래 (다당) Fucaran 효능 개발 연구

From Page No. _____

Subject : 임상시험에 따른 시료의 변역확인을 확인.
(재현실험)

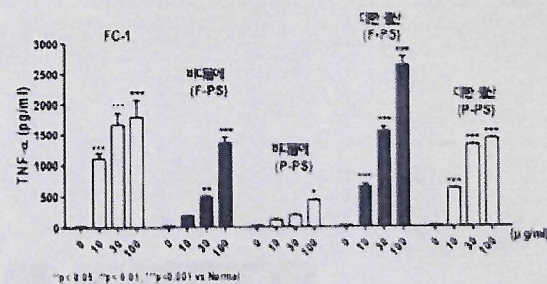
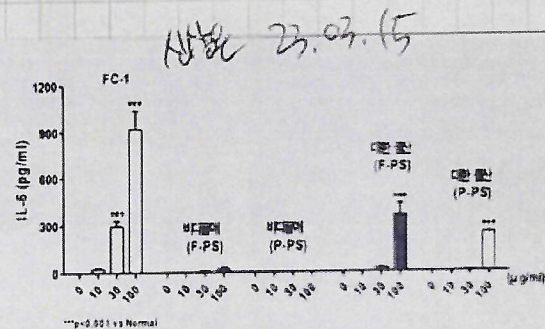
Material/S: P.3 과 동일

Exp. Methods : P.3 과 동일

Results :



원재료	절단 형태	수율 (%)	Fucose 함량 (%)	M. Acid 함량 (%)
대현물산 다시마	Flake	4.0	7.3	3.5
	Powder	8.8	4.0	7.6
바다풀에 다시마	Flake	3.4	11.8	0.3
	Powder	7.6	5.4	6.1



- 다시마 원재료를 flake 형태로 (F-PS) 전단했을 때 powder에 (P-PS) 비해 수율은 낮아지지만 약간의 함량은 줄어지고 fucose 함량은 높아짐.
- flake 형태로 절단하여 추출한 시료가 powder로 추출한 시료보다 높은 함량을 나타냄.

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. Kim

Date. _____

Recorded by _____

Sign. 신상민Date. 23.03.15

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

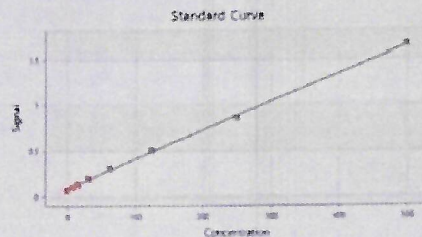
Results

1차 실험 시 결과가 STD range 안에 들지 않음.

새로 batch로 실험 진행하였음.

IL-6

Sample	Conc.	original signal
Std0001	500.0	1.657
Std0002	250.0	0.858
Std0003	125.0	0.4963
Std0004	62.50	0.3022
Std0005	31.20	0.1927
Std0006	15.60	0.1259
Std0007	7.800	0.0584
Std0008	0	0.06238



새로 23.03.15

Where:

a = 0.0729761

b = 0.961415

c = 1.589E+09

d = 2811380

R²: 0.999

$$y = 2.81138E+06 + ((0.0729761 - 2.81138E+06) / (1 + (x/1.58937E+09)^{0.961415}))$$

$$y = d + ((a - d) / (1 + (x/c)^b))$$

	Sample	O D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.06314	0.05990	0.06244	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	LPS	0.8258	1.044	1.133	231.9	302.2	331.0	23190.00	30220.00	33100.00	28836.67	5097.77
Fucoran (FC-1)	10	0.1788	0.1570	0.1401	30.1	23.7	18.8	30.13	23.70	18.77	24.20	5.70
	30	1.1420	0.9728	0.9348	334.1	279.1	266.9	334.10	279.10	266.90	293.37	35.80
	100	1.1920	1.0200	0.9589	350.1	294.4	274.6	1050.30	883.20	823.80	919.10	117.44
바다풍애 (F-PS)	10	0.0714	0.0689	0.0726	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.0776	0.0815	0.0852	1.2	2.2	3.2	1.17	2.20	3.20	2.19	1.01
	100	0.0869	0.0933	0.1147	3.7	5.4	11.5	10.98	16.25	34.38	20.54	12.27
바다풍애 (P-PS)	10	0.0652	0.0734	0.0952	< Min	0.1	5.9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.0636	0.0628	0.0694	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	0.0645	0.0685	0.0644	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
대한물산 (F-PS)	10	0.0701	0.0651	0.0676	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.1802	0.1424	0.1414	30.5	19.4	19.1	30.53	19.42	19.14	23.03	6.50
	100	0.6141	0.4050	0.3646	164.5	99.0	86.5	493.50	296.85	259.35	349.90	125.77
대한물산 (P-PS)	10	0.0665	0.0615	0.0638	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.0989	0.0864	0.0867	7.0	3.5	3.6	6.99	3.52	3.60	4.70	1.98
	100	0.3570	0.3479	0.3370	84.1	81.3	78.0	252.33	243.96	233.88	243.39	9.24

바다풍애, 대한물산 시료 모두 F-PS 가 P-PS 보다 IL-6 생성이 많이 되었으나, 바다풍애 시료는 수치가 매우 낮음.

또한 대한물산의 F-PS 는 FC-1 보다 낮은 IL-6 생성능을 보임.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

23.03.15

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

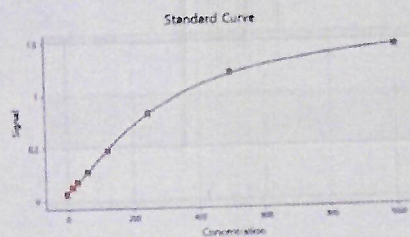
Results

: 1차 실험 결과에 대한 재현실험임.

• 1차 실험 시 FC-1과 대항물산 F-PS는 비슷한 수치의 TNF- α 생성됨.• 2번의 독립적인 실험 결과 대항물산 F-PS는 FC-1과 동등 또는 그 이상의 TNF- α 생성능을 보임.

생성일 23.03.15

TNF- α		
Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.434
Std0002	500.0	1.193
Std0003	250.0	0.8208
Std0004	125.0	0.4609
Std0005	62.50	0.2616
Std0006	31.20	0.1645
Std0007	16	0.1146
Std0008	0	0.05222



Where:

a = 0.07242

b = 1.371450

c = 275.47

d = 1.67308

R² 0.999

$$y = 1.67308 + \{ (0.0724178 - 1.67308) / (1 + (x/275.47)^{1.37145}) \}$$

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.1203	0.1339	0.1342	21.80	26.33	26.42	21.80	26.33	26.42	24.85	2.64
	LPS	0.4164	0.4598	0.4986	107.1	119.8	131.6	5355.00	5990.00	6580.00	5975.00	612.64
Fucoran (FC-1)	10	0.7818	0.7713	0.6969	233.2	228.7	198.9	1166.00	1143.50	994.50	1101.33	93.20
	30	0.6452	0.5417	0.6290	179.8	145.0	174.1	1798.00	1450.00	1741.00	1663.00	186.65
	100	0.6122	0.5864	0.7254	168.3	159.6	209.9	1683.00	1596.00	2099.00	1792.67	268.84
바다풀에 (F-PS)	10	0.1768	0.1649	0.176	39.5	36.0	39.4	197.60	179.90	196.90	191.47	10.02
	30	0.2107	0.2134	0.2056	49.3	50.1	47.9	493.40	501.00	478.70	491.03	11.34
	100	0.5262	0.4773	0.5289	140.1	125.1	141.0	1401.00	1251.00	1410.00	1354.00	89.31
바다풀에 (P-PS)	10	0.1319	0.1110	0.1166	25.7	18.6	20.5	128.35	92.75	102.55	107.58	18.39
	30	0.1045	0.1122	0.1232	16.2	19.0	22.8	161.50	189.70	227.80	193.00	33.27
	100	0.1777	0.1911	0.1956	39.8	43.7	45.0	398.00	437.00	450.00	428.33	27.06
대항물산 (F-PS)	10	0.5496	0.4686	0.459	147.6	122.4	119.6	738.00	612.00	598.00	649.33	77.11
	30	0.6052	0.5390	0.5841	165.9	144.2	152.2	1659.00	1442.00	1522.00	1541.00	109.74
	100	0.8948	0.8408	0.7866	286.8	259.9	235.3	2868.00	2599.00	2353.00	2606.67	257.59
대산물산 (P-PS)	10	0.4799	0.4648	0.4555	125.9	121.3	118.5	629.50	606.50	592.50	609.50	18.68
	30	0.4929	0.4836	0.5047	129.8	127.0	133.4	1298.00	1270.00	1334.00	1300.67	32.08
	100	0.5244	0.5194	0.5356	139.5	138.0	143.1	1395.00	1380.00	1431.00	1402.00	26.21

이러함대, 대항물산 시료 중 F-PS와 P-PS보다 TNF- α 생성이 많이 되었으나,바다풀에 시료보다 대항물산 시료의 TNF- α 수치가 높음.또한 대항물산의 F-PS는 FC-1 보다도 높은 TNF- α 생성능을 보임.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

S. Kim

Date.

Recorded by

Sign.

생성일

Date.

23.03.15

Project Code _____

Title _____

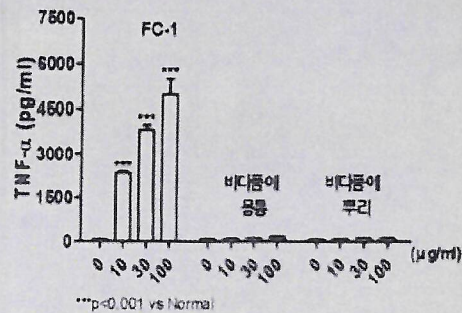
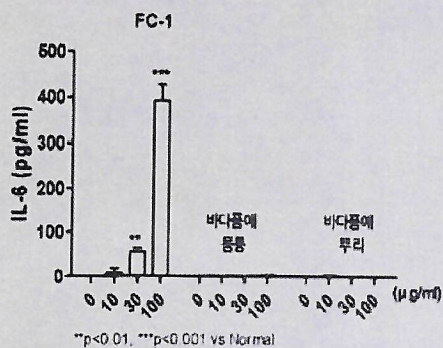
From Page No. _____

Subject : 대시바 밖위에 파른 시료의 면역활성 확인

Materials : FC-1, 바다풍애 몸통, 바다풍애 뿌리

EXP. Methods : page 3 과 동일.

신상원 23.03.22



바다풍애 시료의 몸통과 뿌리 시료의 사이토카인을 측정된 결과 IL-6, TNF-α 의 생성이 거의 되지 않음.

참고) 이전 실험 결과 바다풍애의 시료가 대량복합의 시료보다 활성이 낮았음.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. SS Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 신상원Date. 23.03.22

Project Code _____

Title _____

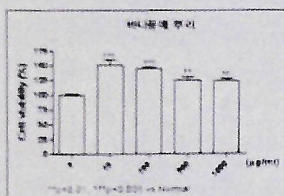
From Page No. _____

Results:

신상준 23.03.22

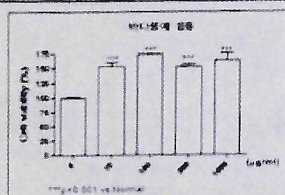
바다풀에 뿌리

Sample	O.D			O.D-BK			Average	Viability (%)			Average	SD
0	1.3878	1.3657	1.3475	1.13330	1.11120	1.09300	1.11250	101.86966	99.883146	98.247191	100.00	1.81
10 μ g/ml	2.0211	1.9540	1.8217	1.76660	1.69950	1.56720	1.67777	158.79551	152.76404	140.87191	150.81	9.12
100 μ g/ml	1.8907	1.8544	1.8784	1.63620	1.59990	1.62390	1.62000	147.07416	143.81124	145.96854	145.62	1.66
500 μ g/ml	1.5658	1.6948	1.6674	1.31130	1.44030	1.41290	1.38817	117.86966	129.46517	127.00225	124.78	6.11
1000 μ g/ml	1.6870	1.6076	1.5899	1.43250	1.35310	1.33540	1.37367	128.76404	121.62697	120.03596	123.48	4.65
BK	0.2545											



바다풀에 몸통

Sample	O.D			O.D-BK			Average	Viability (%)			Average	SD
0	1.3878	1.3657	1.3475	1.13330	1.11120	1.09300	1.11250	101.86966	99.883146	98.247191	100.00	1.81
10 μ g/ml	1.9667	2.0482	1.9013	1.71220	1.79370	1.64680	1.71757	153.90562	161.23146	148.02697	154.39	6.62
100 μ g/ml	2.2580	2.2128	2.0735	2.00350	1.95830	1.81900	1.92693	180.08989	176.02697	163.50562	173.21	8.64
500 μ g/ml	1.9374	2.0238	1.9152	1.68290	1.76930	1.66070	1.70430	151.27191	159.0382	149.2764	153.20	5.16
1000 μ g/ml	2.1491	2.1355	1.9498	1.89460	1.88100	1.69530	1.82363	170.30112	169.07865	152.38652	163.92	10.01
BK	0.2545											



두 시료 모두 1000 μ g/ml 까지 세포독성 없음.
 오히려, 세포증식 경향을 보임.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. Seu Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 신상준Date. 23.03.22

Project Code _____

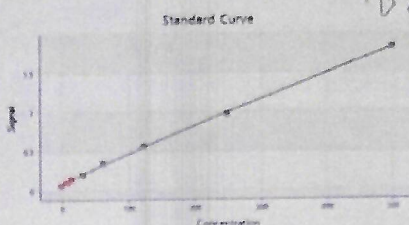
Title _____

From Page No. _____

Results

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	1.807
Std0002	250.0	0.959
Std0003	125.0	0.5629
Std0004	62.50	0.3484
Std0005	31.20	0.2022
Std0006	15.60	0.1376
Std0007	7.800	0.1016
Std0008	0	0.05952



Where:

$a = 0.0665936$
 $b = 0.914459$
 $c = 2.308E+09$
 $d = 2151510$
 $R^2: 0.999$

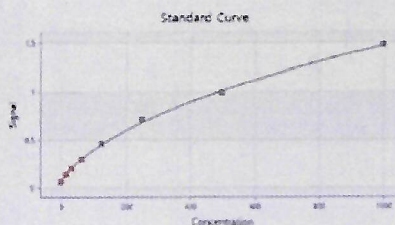
$$y = 2.15151E+06 + (0.0665936 - 2.15151E+06) / (1 + (x/2.30762E+09)^{0.914459})$$

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.0605	0.0615	0.0620	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	LPS 1µg	0.8307	0.8091	0.7847	204.3	198.0	190.9	20430.00	19800.00	19090.00	19773.33	670.40
	LPS 50ng	0.1756	0.2047	0.180	24.3	31.5	25.4	2430.00	3146.00	2536.00	2704.00	386.43
Fucoran (FC-1)	10	0.1612	0.0687	0.0748	20.8	0.3	1.4	20.81	0.32	1.44	7.52	11.52
	30	0.3039	0.2704	0.3280	56.9	48.2	63.2	56.87	48.16	63.22	56.08	7.56
	100	0.5975	0.5265	0.6015	137.2	117.3	138.3	411.60	351.90	414.90	392.80	35.46
바다풀에 음용	10	0.0598	0.0613	0.0590	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	30	0.0636	0.0597	0.0615	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	100	0.0681	0.0654	0.0731	0.2	0.0	1.1	0.65	0.00	3.34	1.33	1.77
바다풀에 뿌리	10	0.0839	0.0646	0.0612	3.2	0.0	0.0	3.24	0.00	0.00	1.08	1.87
	30	0.0692	0.0707	0.0614	0.4	0.7	0.0	0.40	0.68	0.00	0.36	0.34
	100	0.0588	0.0581	0.0590	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

TNF-α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.470
Std0002	500.0	0.982
Std0003	250.0	0.7085
Std0004	125.0	0.4612
Std0005	62.50	0.2949
Std0006	31.20	0.2006
Std0007	16	0.1425
Std0008	0	0.05882



Where:

$a = 0.05129$
 $b = 0.711346$
 $c = 4380$
 $d = 5$
 $R^2: 0.998$

$$y = 5.50102 + (0.0512892 - 5.50102) / (1 + (x/4380.29)^{0.711346})$$

$$y = d + (a - d) / (1 + (x/c)^b)$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
	Normal	0.2902	0.3079	0.3125	57.50	63.89	65.56	57.50	63.89	65.56	62.32	4.25
	LPS 1µg	0.9402	0.8732	0.8903	439.7	385.8	353.2	21985.00	19290.00	17660.00	19645.00	2184.24
	LPS 50ng	0.4044	0.6290	0.6223	102.7	218.7	214.7	5135.00	10935.00	10735.00	8935.00	3292.42
Fucoran (FC-1)	10	0.9740	0.9643	0.995	468.2	459.9	486.4	2341.00	2299.50	2432.00	2357.50	67.77
	30	0.8701	0.8460	0.8898	383.4	365.0	398.8	3834.00	3650.00	3988.00	3824.00	169.22
	100	1.0710	0.9606	0.9901	556.0	456.8	482.2	5560.00	4568.00	4822.00	4983.33	515.30
바다풀에 음용	10	0.1480	0.1414	0.1609	15.5	14.0	18.6	77.60	70.20	92.90	80.23	11.58
	30	0.1306	0.1259	0.1332	11.7	10.7	12.3	116.80	107.30	122.50	115.53	7.68
	100	0.1557	0.1599	0.1482	17.3	18.3	15.6	173.20	183.40	155.60	170.73	14.06
바다풀에 뿌리	10	0.1608	0.1553	0.1579	18.6	17.2	17.8	92.75	86.20	89.20	89.38	3.28
	30	0.1316	0.1224	0.1277	11.9	10.0	11.1	119.10	100.20	110.90	110.07	9.48
	100	0.1272	0.1243	0.1256	11.0	10.4	10.7	109.80	104.00	106.60	106.80	2.91

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. Sh Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. Sh KimDate. 23.03.22

Project Code _____

Title 대하 물산 (대방) Fucaran 중개발 연구

From Page No. _____

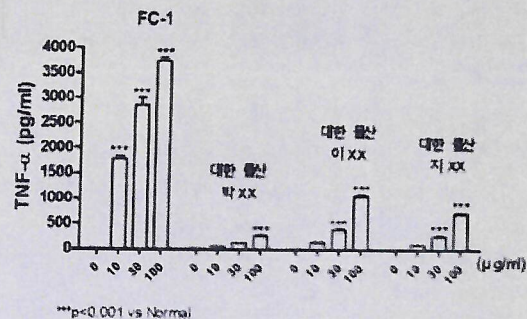
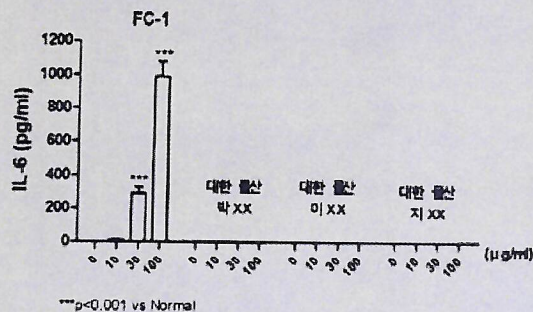
Subject : 대하물산 생상자별 대하 추출물의 면역활성 평가

Materials : ① 대하물산 박 XX
 ② 대하물산 이 XX
 ③ 대하물산 지 XX
 ④ FC-1

Exp. Methods

Page 3 라 동일.

생상자 23.03.29



Results : 대하물산 생상자별 시료에 대한 IL-6 생성은 없었음.

TNF-α 의 생성은 대하물산 이 XX > 대하물산 지 XX > 대하물산 박 XX 임.

그러나 3 시료 모두 FC-1 과 비교하여 면역활성이 매우 낮음.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

Kim

Date.

Recorded by

Sign.

생상자

Date.

23.03.29

Project Code _____

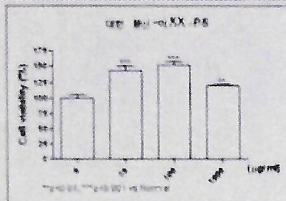
Title _____

From Page No. _____

Results

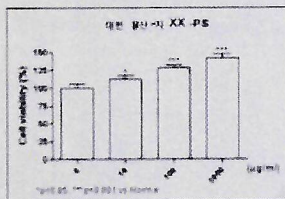
대한물산-이린재-PS

Sample	O.D			O.D-BK			Average	Viability (%)			Average	SD
0	1.2984	1.1959	1.2844	1.29840	1.19590	1.28440	1.25957	103.08307	94.945352	101.97158	100.00	4.41
10 μ g/ml	1.5963	1.7315	1.7159	1.59630	1.73150	1.71590	1.68123	126.73406	137.46791	136.22939	133.48	5.87
100 μ g/ml	1.7962	1.7157	1.8148	1.79620	1.71570	1.81480	1.77557	142.6046	136.21351	144.0813	140.97	4.18
1000 μ g/ml	1.4263	1.4770	1.4301	1.42630	1.47700	1.43010	1.44447	113.23736	117.26255	113.53905	114.68	2.24
BK	0.2047											



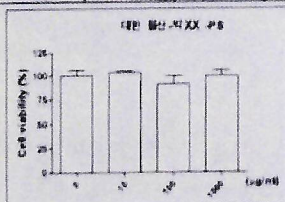
대한물산-지명철-PS

Sample	O.D			O.D-BK			Average	Viability (%)			Average	SD
0	1.2984	1.1959	1.2844	1.29840	1.19590	1.28440	1.25957	103.08307	94.945352	101.97158	100.00	4.41
10 μ g/ml	1.2946	1.3900	1.3825	1.29460	1.39000	1.38250	1.35570	102.78138	110.35541	109.75997	107.63	4.21
100 μ g/ml	1.5455	1.5223	1.5745	1.54550	1.52230	1.57450	1.54743	122.70093	120.85903	125.00331	122.85	2.08
1000 μ g/ml	1.6719	1.7306	1.6928	1.67190	1.73060	1.69280	1.69843	132.73613	137.39646	134.39543	134.84	2.36



대한물산-박지상-PS

Sample	O.D			O.D-BK			Average	Viability (%)			Average	SD
0	1.2984	1.1959	1.2844	1.29840	1.19590	1.28440	1.25957	103.08307	94.945352	101.97158	100.00	4.41
10 μ g/ml	1.2684	1.2759	1.2941	1.26840	1.27590	1.29410	1.27947	100.7013	101.29674	102.74168	101.58	1.05
100 μ g/ml	1.2431	1.0801	1.1096	1.24310	1.08010	1.10960	1.14427	98.692672	85.751714	88.093789	90.85	6.90
1000 μ g/ml	1.2632	1.2364	1.2894	1.26320	1.23640	1.28940	1.26300	100.28846	98.160743	102.36854	100.27	2.10



대한물산 박지 상을 제외한 대한물산 이 XX 와 대한물산 지 XX 는 세포가 증식하는 경향을 보임.

심상원 23.03.29

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. _____

Kim

Date. _____

Recorded by _____

Sign. _____

심상원

Date. _____

23.03.29

Project Code _____

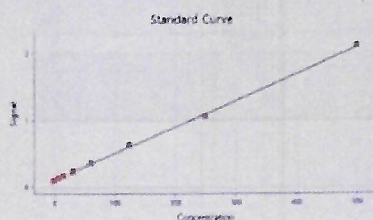
Title _____

From Page No. _____

Results

IL-6

Sample	Conc.	O.D
Std0001	500.0	2.110
Std0002	250.0	1.050
Std0003	125.0	0.6193
Std0004	61.25	0.3504
Std0005	31.20	0.2249
Std0006	15.60	0.1679
Std0007	7.800	0.1299
Std0008	0	0.09244



Where:

a = 0.0040

b = 0.0991

R²: 0.999

$$y = 0.00398829x + 0.0990587$$

$$y = ax + b$$

Sample	O.D	Conc	Dilution factor	Average	SD
Normal	0.09852 0.08657 0.08810	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
LPS 10ng/ml	0.9177 0.9182 0.7813	205.3 205.4 171.1	2053 2054 1711	1939.33	197.7431
LPS 1000ng/ml	1.101 1.198 1.262	251.3 275.5 291.6	25130 27550 29160	27280.00	2028.5216
Fucoran (FC-1) 10	0.1476 0.1345 0.1339	12.16 8.892 8.724	12.16 8.892 8.724	9.93	1.9371002
Fucoran (FC-1) 30	1.098 1.361 1.327	250.6 316.5 307.9	250.6 316.5 307.9	291.67	35.823782
Fucoran (FC-1) 100	1.546 1.391 1.307	362.9 323.9 302.8	1088.7 971.7 908.4	989.60	91.473111
대한물산-박xx 10	0.09493 0.08550 0.1024	< Min < Min 0.8405	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-박xx 30	0.08521 0.08823 0.09211	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-박xx 100	0.08503 0.08802 0.09632	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-이xx 10	0.08611 0.08574 0.08525	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-이xx 30	0.08433 0.09460 0.1042	< Min < Min 1.294	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-이xx 100	0.09011 0.09416 0.08948	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-지xx 10	0.08315 0.07913 0.08353	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-지xx 30	0.1128 0.1004 0.08000	3.454 0.3451 < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0
대한물산-지xx 100	0.08822 0.08362 0.07994	< Min < Min < Min	0.00 0.00 0.00	0.00	0

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. SS Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. SS KimDate. 23.03.29

Project Code _____

Title _____

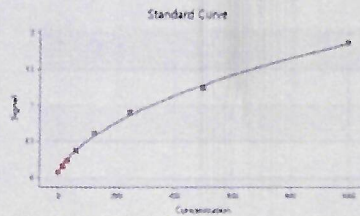
From Page No. _____

Results

KJL 23.03.29

TNF- α

Sample	Conc.	O.D
Std0001	1000	1.857
Std0002	500.0	1.237
Std0003	250.0	0.8949
Std0004	125.0	0.6027
Std0005	61.25	0.3668
Std0006	31.20	0.2327
Std0007	15.60	0.1554
Std0008	0	0.06873



Where:

$a = 0.0504701$
 $b = 0.717589$
 $c = 3445.17$
 $d = 6.20195$
 $R^2: 0.997$

$$y = 6.20195 + ((0.0504701 - 6.20195) / (1 + (x/3445.17)^{0.717589}))$$

$$y = d + ((a - d) / (1 + (x/c)^b))$$

	Sample	O.D			Conc			Dilution factor			Average	SD
Normal		0.2011	0.1694	0.1568	20.29	14.49	12.36	20.29	14.49	12.36	15.71	4.1040996
LPS	10ng/ml	0.8754	0.8579	0.6372	256.1	247.4	237.3	3841.5	3711	3559.5	3704.00	141.13026
	1000ng/ml	0.6753	0.6756	0.6920	165.2	165.3	172.1	8260	8265	8605	8376.67	197.75827
Fucoran (FC-1)	10	1.032	1.060	1.076	340.2	356.4	365.8	1701	1762	1829	1770.67	64.74823
	30	1.347	1.361	1.420	547.0	557.3	602.8	2735	2786.5	3014	2845.17	148.46408
	100	1.091	1.097	1.076	374.7	378.8	366.0	3747	3788	3660	3731.67	65.363088
대한물산-박xx	10	0.1368	0.1322	0.1463	9.200	8.517	10.67	46	42.585	53.35	47.31	5.5010597
	30	0.2057	0.2115	0.2225	21.17	22.33	24.52	105.85	111.65	122.6	113.37	8.5059293
	100	0.2259	0.2340	0.2396	25.24	26.91	28.10	252.4	269.1	281	267.50	14.366976
대한물산-이xx	10	0.2477	0.2356	0.2252	29.85	27.25	25.09	149.25	136.25	125.45	136.98	11.915935
	30	0.4475	0.4353	0.4223	82.98	79.23	75.28	414.9	396.15	376.4	395.82	19.252164
	100	0.5378	0.5094	0.5017	112.9	103.1	100.5	1129	1031	1005	1055.00	65.391131
대한물산-지xx	10	0.1823	0.1862	0.1937	16.76	17.49	18.88	83.8	87.45	94.4	88.55	5.3849327
	30	0.3225	0.3427	0.3692	47.55	52.80	59.98	237.75	264	299.8	267.22	31.199613
	100	0.4027	0.4037	0.4189	69.49	69.78	74.25	694.9	697.8	742.5	711.73	26.68414

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

SK Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

KJL

Date. _____

23.03.29

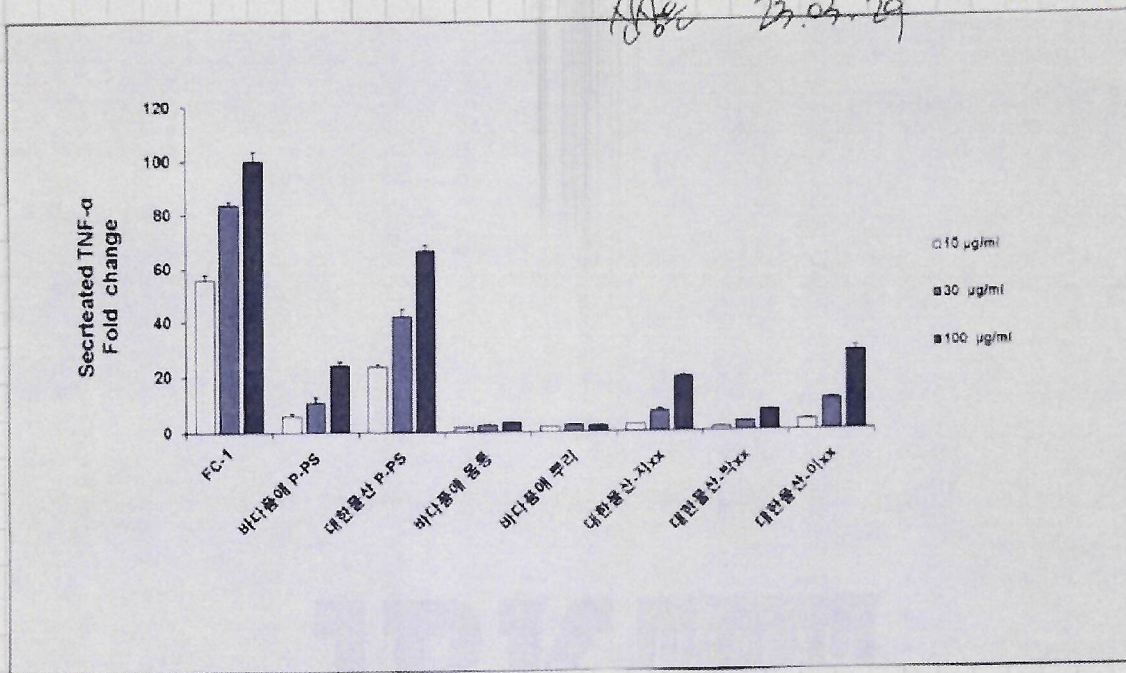
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

P. 13 -27 대아나 요약

신상원 23.03.29



유상지변 경영환경 평가를 통해 최종적으로 도출된 공정에서 많은들의
대아 원료가 우수한 경영환경을 보임을 확인함

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

Kim

Date.

Recorded by

Sign.

신상원

Date.

23.03.29

Project Code _____

Title 대사 유래 (다당) Fucoran 용액 제형 연구

From Page No. _____

Subject : 배치별 지표성분 함량 및 활성평가

Materials : Fucoran 1

Fucoran 2

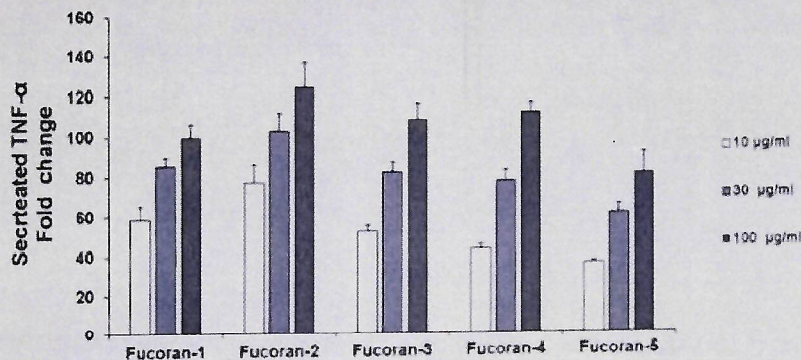
Fucoran 3

Fucoran 4

Fucoran 5

Exp. Methods : Fucose, Mannuronic acid, Guluronic acid 함량 측정.
후원 시리즈 TNF- α 측정.

생남원 23.04.05



시료	제조번호	Fucose 함량 (%)	Mannuronic acid 함량 (%)	Guluronic acid 함량 (%)
Fucoran-1	FG324004	3.1	8.4	2.7
Fucoran-2	GG324003	3.0	8.4	3.0
Fucoran-3	GG334010	2.7	8.1	2.6
Fucoran-4	GG334012	3.0	8.2	2.9
Fucoran-5	GG334017	3.1	8.4	2.6

Results : Fucoran series의 지표성분 함량과 면역활성은 (TNF- α) 측정에서 다른 배치들과 거의 차이가 없음을 확인.

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. 김민 Date. _____

Recorded by _____

Sign. 생남원 Date. 23.04.05

Project Code _____

Title 다사마 유래 (다당) Fucoran 용동 개발 연구

From Page No. _____

Subject : Fucoran 10 mpk, 대한물산 10, 50 mpk 정제투여에 의한 NK cell activity를 확인하고자 함.

Materials : 1. Fucoran

2. 대한물산 (처방문 연경당 제형, 23.12.14 제형, 23.12.15 발송)

3. NK isolation kit (Macs, 130-115-818)

4. cell strainer (Corning, Cat. 352350)

5. Hybridoma media (Gibco, cat. no. 12045076)

6. LHD kit (Dogen, Cat. DG-LDH 500)

7. Macs buffer : PBS (pH 7.2) + 0.5% BSA + 2mM EDTA

→ 0.2 μ m filter

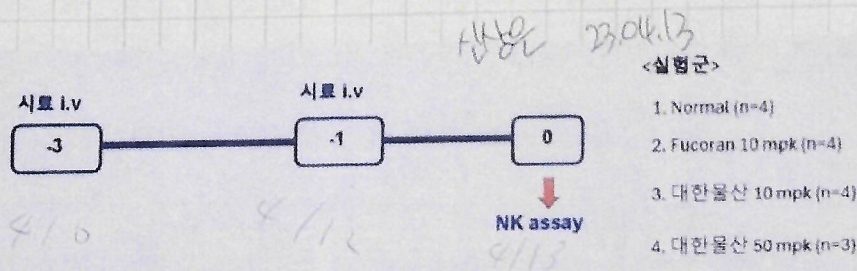
EDTA는 Sodium 이 들어있는 제품을 사용하든 됨

ex) 50 ml 가용 : BSA 250 mg + EDTA 37.2 mg / PBS 50ml

ex) 100 ml 가용 : BSA 500 mg + EDTA 74.4 mg / PBS 100ml

<마우스 투여>

Balb/c (female, 6w)



To Page No. _____

Witnessed by

Sign. S.K. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 상사마Date. 23.04.13

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

<phenotype isolation>

- ① 마우스의 비장을 유전적 조작하여 EPMI 1640 (welone, cat (M011-01) 배양액으로 씻은 후 50:50 골라스를 이용하여 분쇄하여 세포를 유제성.
(각 그룹당 2마리의 세포 분쇄함)
- ② cell grainer에 세포를 가운 후 1000 rpm 에서 7분, 4°C 원심분리 후 상등액 제거
- ③ 세포침전물에 RBC lysis buffer (Gibco, cat. A1049201)를 마당당 2.5ml씩 넣고 3분동안 상온에서 적혈구를 용해시킨 후 PBS 12ml 첨가한 후 1000 rpm 에서 6분, 4°C 원심분리.
- ④ 상등액 제거 후 PBS 12ml 넣고 2분씩 세포 pooling한 후 1000 rpm 에서 7분, 4°C 원심분리
- ⑤ 상등액 제거 후 MACS buffer에 세포침전물을 유제 시킴.
- ⑥ cell counting 후 모든 그룹의 세포수를 맞춘 후 (800 rpm 에서 8분, 4°C 원심분리).

<cell coculture>

Normal (n=4) : 6×10^6 cell/ml, 3mlFucron 10 mpk (n=4) : 7.5×10^6 cell/ml, 1.5ml대항물질 10 mpk (n=4) : 7.16×10^6 cell/ml, 1.5ml대항물질 50 mpk (n=3) : 3.69×10^6 cell/ml, 1.5ml

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. Sh Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 상호Date. 23.04.13

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

< NK cell isolation >

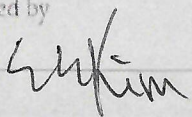
- ① 상등액을 첨가한 제퍼라고 beket 에 160 셀 의 buffer 를 넣음.
(바탕 1개 40 셀 기준)
- ② 40 셀 의 NK cell biotin - antibody cocktail 을 첨가함. (바탕 1개 10ml 기준)
- ③ 호일로 갇힌 후 5분간 ice 에 방치. (양날, 2-8°C or ice 에 부착됨)
- ④ 8ml 의 buffer 를 넣고 1800 rpm 에서 8분, 4°C 원심분리 후 상등액 제거. (바탕 1개 buffer 2ml 기준)
- ⑤ 상등액 제거하고 320 셀 buffer 를 첨가함. (바탕 1개 80 셀 기준)
- ⑥ 80 셀 의 antibiotin microbeads 를 첨가함. (바탕 1개 20 셀)
- ⑦ 잘 섞은 후 호일로 갇힌 10분간 ice 에서 방치함.
- ⑧ 불이 남았을 때 3ml buffer 로 column 을 washing 함.
-X 주의 : column 은 낮거나 앞쪽도 향해 있어야 재성이 잘 발생함.
- ⑨ cell 을 column 에 통과시킴. → Hybridoma media 3ml 을 흘려서 cell 을 흡수함.
- ⑩ 1800 rpm 에서 8분, RT, 원심분리
- ⑪ 세포에 hybridoma media 1.5ml 넣고 counting.

< cell coculture >

Normal (n=4) : 6×10^6 cell/ml $\rightarrow$ 3mlFucoran 10 MPK (n=4) : 7.5×10^6 cell/ml, 1.5ml다항독소 10 MPK (n=4) : 7.16×10^6 cell/ml, 1.5ml다항독소 50 MPK (n=3) : 3.69×10^6 cell/ml, 1.5ml

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. 

Date. _____

Recorded by

Sign. 

Date. 23.04.13

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

<Effect target cell coculture>

1. NK 세포를 아래 비율에 맞춰 round bottomed 96-well plate (cat. 34096) 100 μ l 씩 seeding.

E/T ratio : 25:1 , 10:1 , 5:1 , 2:1

2. YAC-1 세포를 2×10^5 cell/ml로 100 μ l 씩 seeding (Hybridoma media)

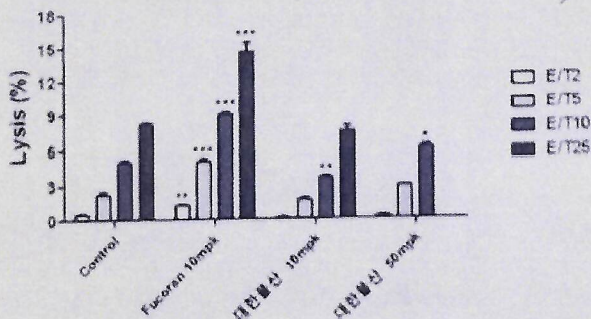
3. LDH kit protocol (Doogen, cat. DG-LDH 500) 이 따라 YAC-1 (high control), background (배지만 있는 well) 에 lysis buffer 20 μ l 넣고 pipetting 후 5분동안 방치 $\rightarrow$ 흡입물리 후 20 μ l 연음

4. 96 well plate 에 E, E/T, YAC-1 (high control), YAC-1 (low control), background, volume control 각 20 μ l 씩 넣고 kit의 working solution 100 μ l 씩 넣음.

5. 상온에서 30분에 걸쳐 30-60분간 빛을 쬔 후 450 nm 에서 흡광도 측정

Results

실험일 23.04.13



* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 vs each E/T control

• Fucoran 정제 투여에 의한 NK세포 활성 확인 (control 대비 약 8배)

• 대만물산 10, 50mg/ml 투여에 의한 NK 활성은 거의 보이지 않음

• In Vitro 결과와 in Vivo NK세포 활성 평가는 동일한 결과를 보여줌

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

신영숙

Date. _____

23.04.13

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

Results (Raw data)

YAC-1 : 2×10^5

1682 23.04.13

E	Control			Fucoran 10mpk			대한물산 10mpk			대한물산 50mpk		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6
	0.080	0.121	0.190	0.087	0.138	0.248	0.080	0.116	0.175	0.088	0.122	0.192
	0.078	0.118	0.185	0.087	0.141	0.234	0.077	0.113	0.169	0.077	0.114	0.184
	0.078	0.117	0.180	0.085	0.140	0.247	0.078	0.121	0.171	0.078	0.119	0.187
	0.079	0.119	0.165	0.087	0.140	0.243	0.078	0.117	0.172	0.081	0.118	0.187

E/T	0.096	0.146	0.231	0.110	0.187	0.316	0.094	0.141	0.209	0.099	0.154	0.241
	0.097	0.148	0.235	0.112	0.186	0.319	0.094	0.145	0.212	0.101	0.153	0.244
	0.099	0.150	0.237	0.112	0.194	0.322	0.096	0.143	0.213	0.099	0.153	0.246
	0.101	0.156	0.235	0.112	0.192	0.321	0.097	0.147	0.215	0.098	0.154	0.249

Yac-1(H.C)	Yac-1 (L.C)	V.C	background
0.7363	0.0668	0.0503	0.0511
0.7460	0.0659	0.0505	0.0514
0.7307	0.0673	0.0506	0.0520
0.7417	0.0678	0.0513	0.0516
0.738675	0.06695	0.050675	0.051525

A (LDH experimental-background : Resulting from co-culture of E and T)

B (LDH spontaneous -background : Resulting from separate cultures of YAC-1 cells(low control))

C (LDH effector cells -background : Resulting from separately cultured E)

D (LDH maximal-volume control : Resulting from total lysis of YAC-1 cells by lysis buffer (high control))

cytotoxicity(%) = (A-B-C)/(D-B)*100

A	Control			Fucoran 10mpk			대한물산 10mpk			대한물산 50mpk		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6	4×10^5	1×10^6	2×10^6
	0.045	0.094	0.180	0.058	0.135	0.264	0.042	0.089	0.157	0.047	0.102	0.189
	0.046	0.097	0.183	0.061	0.134	0.257	0.043	0.093	0.160	0.049	0.101	0.192
	0.047	0.098	0.186	0.060	0.142	0.271	0.045	0.092	0.161	0.047	0.102	0.194
	0.049	0.104	0.184	0.060	0.140	0.269	0.045	0.095	0.163	0.047	0.103	0.197

D	0.690
B	0.016

C	0.027	0.067	0.133	0.035	0.088	0.191	0.027	0.065	0.120	0.030	0.067	0.136
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

cytotoxicity(%)	0.232	1.651	4.509	1.033	4.568	8.464	-0.079	1.216	3.085	0.188	2.897	5.473
	0.351	1.978	5.028	1.389	4.450	8.894	-0.020	1.765	3.545	0.514	2.719	5.918
	0.603	2.215	5.384	1.374	5.621	9.414	0.292	1.587	3.708	0.173	2.823	6.230
	0.885	3.090	5.102	1.300	5.340	9.147	0.307	2.121	3.931	0.114	2.927	6.660

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

23.04.13

Project Code _____

Title 나사나 유래 (지상) Fucoran 공동 개발 연구

From Page No. _____

Subject : 약용 특이 효 활성제의 폐 전이 억제 효능 확인

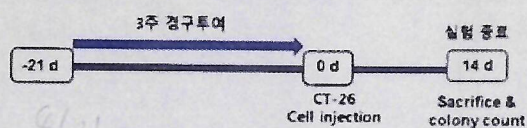
Materials : Fucoran,

CT26

BOVIN'S Solution (BIO GNOST, REF, BCU-OT-1L)

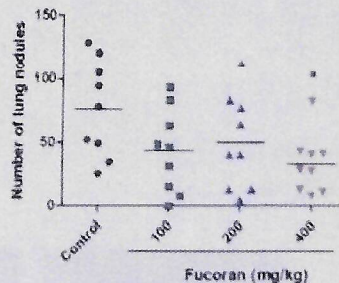
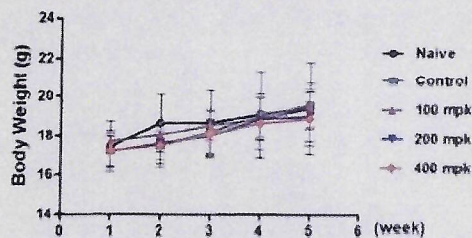
Exp. Methods : 혈관을 농도별로 각각동안 정맥 투여한 후 CT-26 세포를
대정맥으로 투여하고 14 일 뒤 폐에 정해진 콜로니를 확인함.

실험 23.05.22



<실험 그룹>

1. Naive (n=8)
2. Control (CT-26 cell injection) (n=9)
3. Fucoran 100 mpk p.o (n=9)
4. Fucoran 200 mpk p.o (n=9)
5. Fucoran 400 mpk p.o (n=9)



Results : 투여기간 동안 control 대비 체중변화 없음.

• 약제 투여를 주입하지 않은 naive 군은 콜로니가 관찰되지 않음

• control과 비교하여 fucoran 400 mpk 투여 그룹에서 콜로니 수가 유의적으로 감소함.

• control 대비 약 58% 감소.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. 김상민Date. 23.05.22

Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

Results (Raw data)

Naive								
Control								
	25	121	49	105	52	34	94	129
Fucoran 100 mpk								
	0	8	31	48	83	93	15	63
Fucoran 200 mpk								
	83	5	64	40	113	77	13	40
Fucoran 400 mpk								
	40	82	43	11	28	13	41	27

Sible 23.05.22

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

S. Kim

Date. _____

23.05.22