



식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

※ 뒤쪽의 유의사항을 읽고 작성하기 바라며, []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다.

보고인	성명 장봉근	생년월일(법인등록번호)
	주소 경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 104동 802호 (마북동,삼거마을삼성래미안1차(아))	1968년 09월 30일 (1101113872250) 전화번호 031 742 7022 휴대전화
영업소	명칭(상호) 주식회사 제이비케이랩	영업등록번호 20100358177
	소재지 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 464(상대원동, 드림테크노아파트형공장 2층)	
제품정보	식품의 유형 액상차	요청하는 품목제조보고번호 20100358177274
	제품명 시아플렉스 에프 시럽	
	소비기한 제조일로부터 24개월	
	품질유지기한	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율 ※ 뒤쪽에 적습니다.	
	용도 · 용법 뒷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질 뒷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위 뒷장에 기재	
	성상 진한 적자색의 액상제품으로 고유의 향미가 있다	
	위탁생산 여부 []에 [√]아니오	
	· 수탁 영업소의 명칭 및 소재지:	
	· 수탁 영업소의 영업의 종류:	
	· 위탁제조공정:	
	품목의 특성	
■ 고열량 · 저영양 식품에 해당하는지 여부 []에 []아니오		
■ 영유아용으로 표시해 판매하는 식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오		
■ 고령친화식품으로 표시해 판매하는 식품에 해당하는지 여부 []영양성분 조절제품 []경도 조절제품 []점도 조절제품 [√]해당 없음		
■ 대체식품으로 표시해 판매하는 식품에 해당하는지 여부 []에 []아니오		
■ 기능성표시식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오		
■ 살균 · 멸균 제품에 해당하는지 여부 []비살균 [√]살균 []멸균		
■ 영양성분 표시의무 식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오		
기타	없음	

「식품위생법」 제37조제6항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2021년 03월 30일

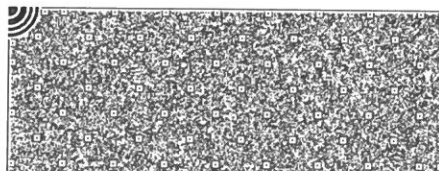
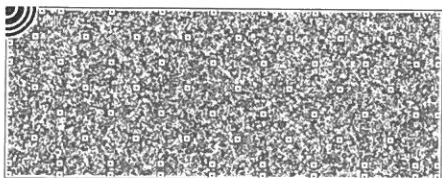
보고인 장봉근

(서명 또는 인)

경기도 성남시장 귀하

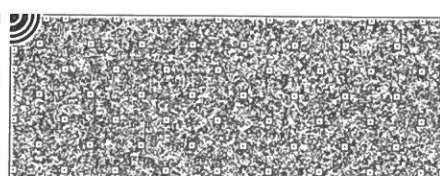
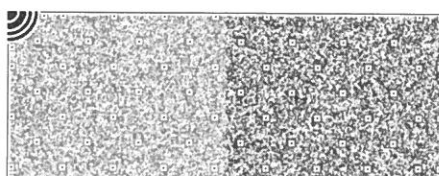
품목제조보고번호 : 20100358177274

처리부서	환경보건국 위생정책과	처리자성명	김진솔	처리일자	2024년 09월 04일
------	-------------	-------	-----	------	---------------





용도용법	1일 1회~수회, 1회 1포(20 g)씩 바로 섭취하거나, 기호에 맞게 물이나 음료에 타서 섭취하십시오.
보관방법 및 포장재질	직사광선과 고온다습한 곳을 피해 실온에 보관하십시오. 개봉 후에는 가급적 빨리 드십시오. PE, HDPE, PET, PP, 유리병
포장방법 및 포장단위	1~5000 ml 등





식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

※ 뒤쪽의 유의사항을 읽고 작성하기 바라며, []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다.

보고인	성명 장봉근	생년월일(법인등록번호) 1968년 09월 30일 (1101113872250)
	주소 경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 104동 802호 (마북동, 삼거마을삼성래미안1차(아))	전화번호 031 742 7022 휴대전화
영업소	영칭(상호) 주식회사 제이비케이랩	영업등록번호 20100358177
	소재지 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 464(상대원동, 드림테크노아파트형공장 2층)	
제품정보	식품의 유형 기타가공품	요청하는 품목제조보고번호 20100358177327
	제품명 안토시아닌-후코이단 복합체 분말G(AFNCP-G)	
	소비기한 제조일로부터 24개월	
	품질유지기한	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율 ※ 뒤쪽에 적습니다.	
	용도 · 용법 뒷장에 기재	
	보관방법 및 포장재질 뒷장에 기재	
	포장방법 및 포장단위 뒷장에 기재	
	성상 고유의 색택과 향미를 지니며, 이미, 이취가 없는 분말	
	위탁생산 여부 []에 [√]아니오	
	· 수탁 영업소의 명칭 및 소재지: · 수탁 영업소의 영업의 종류: · 위탁제조공정:	
	품목의 특성 ■ 고열량 · 저영양 식품에 해당하는지 여부 []에 []아니오 ■ 영유아용으로 표시해 판매하는 식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오 ■ 고령친화식품으로 표시해 판매하는 식품에 해당하는지 여부 []영양성분 조절제품 []경도 조절제품 []점도 조절제품 [√]해당 없음 ■ 기능성표시식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오 ■ 살균 · 멸균 제품에 해당하는지 여부 [√]비살균 []살균 []열균 ■ 영양성분 표시의무 식품에 해당하는지 여부 []에 [√]아니오	
기타	아로니아다시마추출복합분말	

「식품위생법」 제37조제6항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2022년 11월 09일

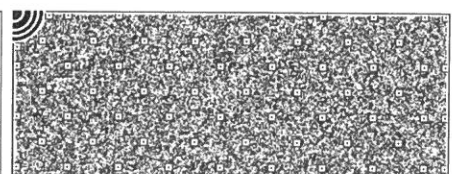
보고인 장봉근

(서명 또는 인)

경기도 성남시장 귀하

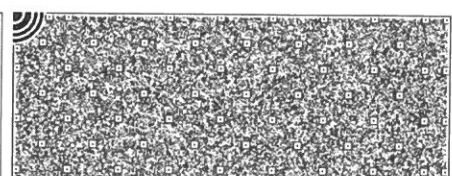
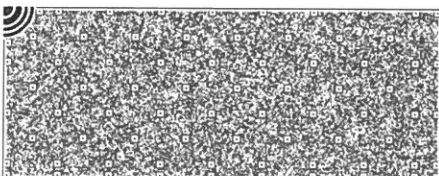
품목제조보고번호 : 20100358177327

처리부서	환경보건국 위생정책과	처리자성명	김현정	처리일자	2024년 06월 07일
------	-------------	-------	-----	------	---------------





용도용법	식품등의 원료로 사용한다.
보관방법 및 포장재질	직사광선과 고온 다습한 곳을 피하여 실온에 보관한다. PE, HDPE, PET, PP/밀봉포장
포장방법 및 포장단위	밀봉포장 / 1~1000g, 1~200kg



공동기술개발 계약서

(주)제이비케이랩(이하 “갑”이라 한다)과 김 의 신(이하 “을”이라 한다)은 다음과 같이 공동기술개발 계약을 체결한다. (이하 “본 계약”)

제 1 조(계약의 목적)

“본 계약”은 “갑”과 “을”이 공동기술개발을 함께 수행하는데 필요한 권리 및 의무 등 제반사항을 정하는 것을 목적으로 한다.

제 2 조(공동기술개발의 목표 및 과업범위)

- ① “본 계약”에 따른 공동기술개발의 목표는 ‘후코란의 개발 논리와 아로니아와 후코이단의 배합논리, 배합비율, in vitro, in vivo 평가, 최종시제품 생산, 평가’ 업무 수행으로 한다.
- ② “본 계약”에 따른 공동기술개발의 과업범위는 다음 각 호로 한다.
 1. 후코란의 개발 논리 확립
 2. 아로니아와 후코이단의 배합 논리 및 비율 연구
 3. in vitro 및 in vivo 효능평가를 통한 최종시제품 생산 및 평가

제 3 조(공동기술개발기간)

“본 계약”에 따른 공동기술개발기간은 2022 년 8 월 21 일 부터 2023 년 8 월 20 일까지로 한다. 다만, “갑”과 “을”의 서면합의에 의하여 공동기술개발기간은 변경될 수 있다.

제 4 조(공동기술개발의 역할)

① “본 계약”에 따른 “갑”의 역할은 총괄 관리, 자금 조달 및 연구 성과물의 상용화 추진 으로 한다.

② “본 계약”에 따른 “을”의 역할은 연구개발 및 기술적 자문으로 한다.

제 5 조(보수, 성과금 및 비용지급)

① “갑”이 “을”에게 지급해야 하는 공동기술 개발 업무 수행의 보수는 총 오천만원(50,000,000 원, 제세공과금 원천징수)으로 정하며, “갑”은 총 보수액을 “본 계약” 기간 동안 매월 균등 분할하여 제세공과금 원천 징수 후 “을”이 지정한 계좌로 매월 10 일에 지급하기로 한다.

② “을”의 공동기술개발 성과에 따라, “갑”은 주식매수청구권을 부여할 수 있으며, 주식매수청구권의 구체적인 조건과 부여 시기는 양 당사자 간 별도 서면 협의에 따라 정하기로 한다.

③ “을”이 공동개발 업무 수행에 필요한 비용이 발생할 경우, “을”은 이를 “갑”에게 사전에 통보하여 승인을 득한 후 집행하도록 한다.

④ “갑”은 공동기술개발을 위한 상호 협의 및 진행 경과 확인을 위하여 정기적인 회의를 개최할 수 있으며, 상호 합의 하에 회의 일정과 내용을 조정할 수 있다.

⑤ “을”은 공동기술개발 업무 수행 및 완료 후, “본 계약” 종료 30 일 전까지 연구 보고서를 제출해야 하며, 필요 시, “갑”의 요청에 따라 연구 보고서를 수정 또는 보완해야 한다.

제 6 조(신의성실의무 및 정보교환의무)

① “본 계약”에 따른 공동기술개발 수행시 “갑”과 “을”은 신의를 가지고 성실히 수행할 의무가 있다.

② “갑”과 “을”은 공동기술개발 수행시 필요한 정보를 상대방에게 서면(전자문서 포함)으로 요청하여야 하며, 이러한 요청이 합리적이라고 판단되는 경우 상대방은 이를 제공할 의무가 있다.

제 7 조(비밀유지의무)

① “본 계약”에서 ‘비밀정보’라 함은 본 공동기술개발을 수행하는 과정에서 “갑”과 “을”이 상대방에게 제공하는 각종 데이터, 경영정보, 영업비밀 뿐만 아니라 본 연구의 수행으로 새롭게 생성되는 연구결과, 기술정보, 지식재산권 등 공동기술개발 성과물 일체를 포함하며, 유무형의 여부 및 그 기록 형태를 불문한다.

② “갑”과 “을”은 “본 계약”과 관련하여 입수한 일체의 비밀정보를 다른 당사자의 서면동의 없이 제 3 자에게 누설하거나 “본 계약”이행 이외의 목적으로 사용하지 못한다.

제 8 조(공동기술개발 성과물의 확인)

① “갑”과 “을”은 공동기술개발기간 동안 매 1 개월마다 1 회씩 중간점검 회의를 실시하는 것을 원칙으로 한다.

② 본 공동기술개발은 공동기술개발 성과물을 공동으로 검토하여 상호승인함으로써 완료된다.

③ 공동기술개발 성과물에 대한 하자발생시 하자에 책임이 있는 당사자는 (30)일 이내에 해당 하자를 시정하여 시정된 성과물을 상대방에게 제공해야 한다.

제 9 조(공동기술개발 성과물의 귀속)

“본 계약”에 따른 공동기술개발의 성과물 및 이와 관련된 특허권, 실용신안권, 저작권 등 모든 지식재산권(이하 ‘지식재산권’이라 한다)과 영업비밀은 “갑”의 소유로 한다.

제 10 조(공동기술개발 성과물의 실시)

① “갑”과 “을”은 다른 약정이 있는 경우를 제외하고는 “갑”은 공동개발 결과물에 대해 독점적인 실시권을 행사할 수 있는 권리를 가진다.

② “을”은 “갑”의 사전 서면 동의 없이 개발 결과물의 전부 또는 일부를 사용할 수 없으며, 제 3 자에게 실시권을 양도하거나 재실시권을 부여할 수 없다.

③ “갑”은 필요에 따라 “을”에게 개발 결과물의 실시권 행사에 필요한 지원을 요청할 수 있으며, “을”은 이에 협조하여야 한다. 실시권 행사와 관련된 구체적인 조건은 “갑”과 “을”이 별도 협의에 따라 결정한다.

제 11 조(양도의 제한)

“갑”과 “을”은 사전 서면동의 없이는 “본 계약”에서 정한 권리 및 의무를 제 3 자에게 양도하지 못한다.

제 12 조(손해배상)

“갑”과 “을”은 “본 계약”내용을 위반하여 상대방에게 손해를 입힌 경우 그 손해를 배상할 책임이 있다.

제 13 조(공동기술개발의 실패)

① “갑”과 “을”은 제 3 조의 공동기술개발기간 종료시 목표한 공동기술개발이 완료되지 않을 경우, 제 3 조의 공동기술개발기간을 연장할 것인지, 또는 실패로 처리할 것인지를 상호 합의하여 결정한다.

② 제 1 항에 의거 "갑"과 "을"이 상대방의 귀책사유 없이 공동기술개발을 실패로 처리할 경우 "본 계약"은 종료되며, 종료일까지 각자 개발한 성과물은 각자의 소유로 하되 "갑"과 "을"이 상호 합의시에는 공동소유로 한다.

제 14 조(계약의 효력)

"본 계약"의 효력은 제 3 조에서 정한 공동기술개발기간으로 한다. 다만, 제 8 조 내지 제 10 조의 조항은 개별 법률에서 정하고 있는 지식재산권의 존속기간 동안 그 효력을 가지며, 제 18 조 조항은 분쟁해결 기간 동안 그 효력을 가진다.

제 15 조(계약의 변경)

"본 계약"의 내용 중 중대한 변경사항이 발생한 경우 "갑"과 "을"은 서면합의에 의하여 "본 계약"의 내용을 변경할 수 있다.

제 16 조(계약의 해지)

"갑"과 "을"은 상대방이 다음 각 호의 행위를 한 경우, 30 일의 기간을 두고 시정을 최고한 후에도 이를 불이행하거나 시정할 의사가 없다고 판단되면 "본 계약"을 해지할 수 있다.

1. 정당한 사유 없이 본 공동기술개발 수행에 협력하지 않는 경우
2. "본 계약"을 이행하는 데 부정 또는 부당한 행위를 한 경우
3. "본 계약"의 내용을 위반한 경우

제 17 조(불가항력)

"갑"과 "을"은 천재지변이나 전쟁 등 불가항력적인 원인에 의하여 "본 계약"상의 의무를 이행할 수 없는 경우에는 상대방에 대하여 이로 인한 손해배상책임을 지지 아니한다.

제 18 조(분쟁해결)

① “본 계약”에 명시되지 아니한 사항은 “갑”과 “을”이 서로 협의하여 정하고, “본 계약”의 이행과정에 있어 분쟁이 있을 경우 “갑”과 “을”은 제 1 호 내지 제 3 호의 조정·중재를 통해, 우선적으로 해결할 수 있도록 상호 노력한다.

1. 「중소기업기술 보호 지원에 관한 법률」제 23 조에 의한
중소기업기술분쟁조정·중재위원회에 의한 조정·중재

2. 「발명진흥법」제 41 조에 의한 산업재산권분쟁조정위원회에 의한 조정

3. 대한상사중재원에 의한 조정·중재

② “갑”과 “을”은 조정이 불성립하거나 「중재법」제 33 조 제 2 항에 의한 중재절차의 종료결정시에는 소송을 통해 해결할 수 있으며, 소송의 관할은 서울지방 법원으로 한다.

③ “갑”과 “을”은 지식재산권 등 공동기술개발 성과물과 관련하여 제 3 자와의 사이에 분쟁이 발생하거나 발생할 우려가 있는 경우에는 이를 즉시 상대방에게 통지하여야 하며, “갑”과 “을”은 이를 협의하여 처리한다. 비용분담 기타 분쟁의 처리에 필요한 사항은 “갑”과 “을”이 협의하여 정한다.

“본 계약”을 증명하기 위해 “본 계약”서는 2 부를 작성하여 “갑”과 “을”이 서명 또는 기명 날인하여 각각 1 부씩 보관한다.

2022 년 8 월 21 일

(갑) 회사명 : (주)제이비케이랩

주 소 : 경기도 성남시 중원구 둔촌대로 464, 2 층

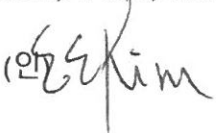
대 표 : 장 봉 근



JEBK LAB

(을)성명: 김의신

주소: 5126 Scholarship Irvine, CA 92621, USA

서명: 김의신 (인) 

JENLAB

자문 계약서

(※ 제이비케이랩(이하 “갑”이라 한다.)과 김의신(이하 “을”이라 한다.)은 아래와 같이 자문계약 (이하 “본 계약”)을 체결한다.

제1조 (목적)

“본 계약”은 “갑”의 AFNC (Anthocyanin Fucoidan Nano Complex) 및 AFNC를 이용한 제품 (시아플렉스 에프 등)의 연구.개발과 관련한 기술적 자문 및 국내외 홍보 지원 등에 관하여 “을”을 자문 위원으로 위촉하고 이를 이행하는데 필요한 제반 사항을 규정하는 것을 목적으로 한다.

제2조 (계약의 내용 및 범위)

“본 계약”의 이행을 위하여, “을”은 “갑”의 자문위원으로서 아래의 업무를 수행한다.

1. “갑”의 AFNC 및 AFNC를 이용한 제품의 연구.개발에 대한 기술적인 자문
2. “갑”의 기업/제품 홍보 일환으로 “갑”이 제작하는 홈페이지, 온라인사이트, SNS, 유튜브, 회사소개서, 브로셔, 도서, 간행물, 기록 편집물 (광고 크레덴셜/하이라이트, 브랜드 사이트 내 히스토리 콘텐츠) 등 “갑”의 기업/제품 홍보와 관련된 국.내외 각종 매체 및 채널 (이하 “홍보 매체”)에 “을”의 기술 자문 내용, 추천사, 사진 등을 활용할 수 있도록 지원
3. “갑”이 요청하는 경우, 자문 업무에 대한 보고서 제출
4. “갑”이 요청하는 경우, “갑”의 제품 추천 및 홍보를 위하여, 강의 및 행사 등에 참석 또는 강연 (별도의 수수료 지급)
5. 기타 “갑”이 경우에 따라 위촉하고 “을”이 수락하는 업무 (필요시 별도 수수료 지급)

제3조 (보수 및 비용)

1. “갑”이 “을”에게 위촉 업무 수행의 보수로서 지급해야 할 자문료는 총 육천만원 (60,000,000원, 제세공과금 원천징수액 포함, 이하 “총자문료”)으로 정하며, “갑”은 “총 자문료”를 12개월로 분할 또는 일할 계산하여 제세공과금 원천징수 후 “을”에게 익월 10일에 지급하도록 한다.
2. “을”의 위촉 업무 수행에 필요한 비용이 발생한 경우, “을”은 이를 “갑”에게 사전 통보하여 승인을 득한 후 집행하도록 하며, “갑”은 “을”이 청구한 해당 비용을 “을”에게 지급하도록 한다.

제4조 (비밀유지)

“을”은 “갑”의 사전 서면 승낙이 없는 한 본 계약 수행 중 지득하게 된 “갑”의 경영, 기술 및 영업 상의 정보 및 자료 등(이하 “비밀 정보”이라 함)을 본 계약 이행 및 자문 활동 범위 내에서만 사용하여야 하며, 계약 종료시 비밀 정보와 관련된 모든 자료를 폐기하며, 계약 기간 종료 이후에도 비밀 정보를 제3자에게 누설하거나 자신을 위해 사용할 수 없다.

제5조 (지식재산권)

1. “본 계약” 체결 전 양 당사자가 보유한 지식재산권은 각자에 귀속된다.
2. “본 계약” 이행을 통해 얻은 기술 및 영업정보, 노하우 및 이를 응용하여 취득한 지식재산권에 대한 소유권 및 일체의 권리는 “갑”의 소유로 한다.
3. “을”은 계약 기간 및 종료 이후에도, 본 계약 기간 중 완성된 기술 자문 결과물을 “갑”이 “홍보 매체”에 “갑”의 기업/제품 홍보 목적에 한해 활용할 수 있으며, 필요 시, “을”의 소속, 성명, 이력 및 사진 등을 활용할 수 있음에 동의한다.

제6조 (계약기간)

1. “본 계약”의 기간은 2024년 8월 21일부터 2025년 8월20일까지로 한다.
2. “갑”과 “을”은 계약기간 만료 시 상호 서면 합의에 의해 계약 기간을 연장할 수 있다.

제7조 (계약의 해지)

1. “갑” 또는 “을”은 어느 일방이 본 계약을 이행하지 않거나, 계약의 지속이 불필요하다고 판단될 경우 제6조의 계약기간에 상관없이 상호 협의를 거쳐 계약을 해지할 수 있다. 해지에 따른 합의사항은 별도로 정한다.
2. “갑”은 “을”이 본 계약에 따른 의무를 중대하게 위반하는 경우, 서면 통보 후 “본 계약”을 해지 할 수 있다.

제8조 (신의성실)

“갑”과 “을”은 “본 계약”과 관련하여 상대방의 명예가 훼손되지 않도록 주의를 다하고, 신의와 성실에 입각하여 계약을 이행하기로 한다.

제9조 (계약 해석)

“본 계약”에 명시되지 않은 사항은 일반 상관례에 따르며 계약 이행에 대한 이의가 있을 시 상호 협의하여 조정한다.

제10조 (합의 관할)

“본 계약과 관련하여 당사자 간에 발생하는 모든 분쟁, 논쟁 또는 의견 차이로 소송을 제기 할 시에는 ”갑“의 소재지 관할법원으로 한다.

위와 같이 계약을 체결하고 계약서 2부를 작성, 서명 날인 후 ”갑“과 ”을“이 각각 1부씩 보관한다

2024년 8월 21일

”갑“

주소 : 경기도 성남시 중원구 둔촌대로
464 드림테크노 2층

상호 : (주)제이비케이랩

대표자 : 장봉근



”을“

주소 : 5126, Scholarship
Irvine, CA 92621, USA

주민번호 : 421003-1052019

성명 : 김의신

(인) 

JBN LAB

CONFIDENTIAL

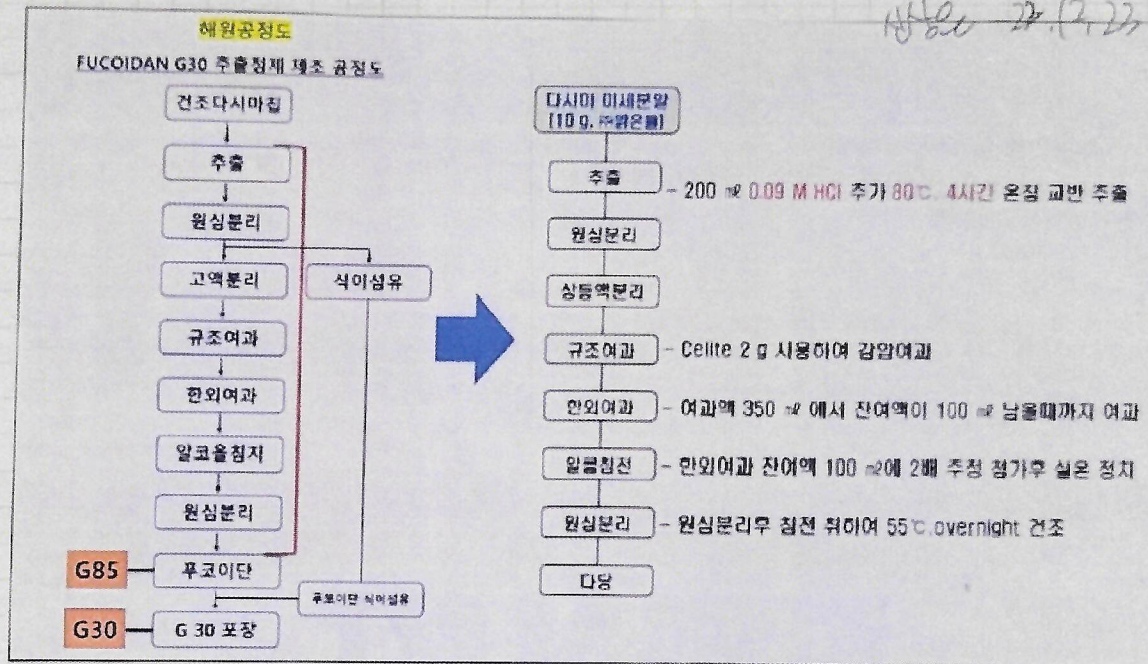
Project Code

Title 다시마 유래 (다당) Fucoidan 분획 개발 연구

From Page No.

Subject : 후코이단 분획을 다시마 추출물에서 추출한 후 정제된 조건 설정 실험

실험일 22.12.23



해원의 공정도 향하여 정제된 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 다당침전까지 얻은 2번째 원료의 활성 측정
(다당침전 생성 후 100 mesh에 걸러진 침전과 통과한 침전 사이의
활성 차이 비교)
- 새로운 양식의 대사 분말을 이용하여 제조한 대사 농액의
활성 비교

Materials

신상호 22.12.23

시료 코드	제조 방법	중부량 (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, 규조여과하였고, 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, 규조여과하였고, 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.

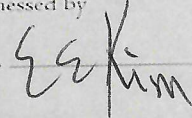
1) ELISA stop solution (2N H₂SO₄) Inuitrogen, Cat no. SSC4

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

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

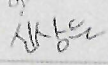
To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. 

Date. _____

Recorded by _____

Sign. 

Date. 22.12.23

Project Code _____

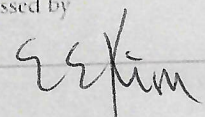
Title _____

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. 

Date. _____

Recorded by

Sign. 신상원

Date. 22.12.23

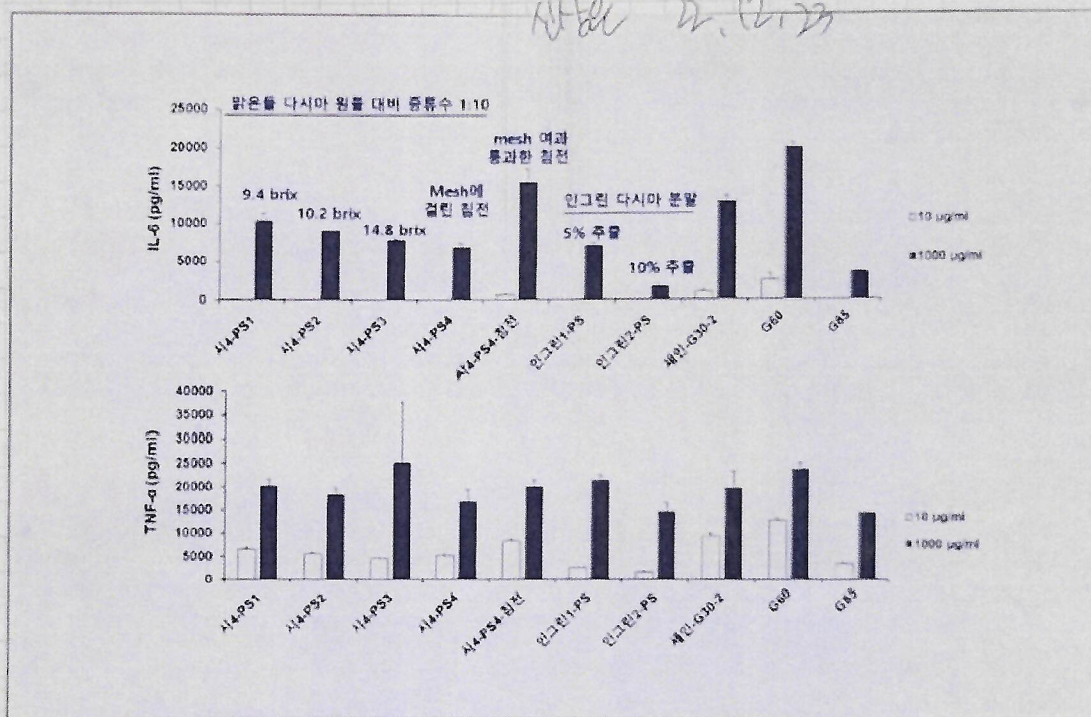
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

- (14) substrate solution 100 μ l 를 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.

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

* 추출 : 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 _____

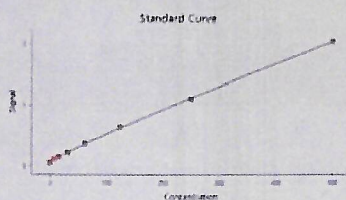
Title _____

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	254.8		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.

S. Kim

Date.

Recorded by

Sign.

S. Kim

Date.

22.12.23

Project Code _____

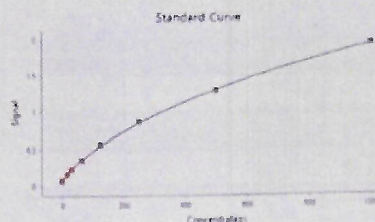
Title _____

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



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

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	99.40
	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	1.736	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	0.6544	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 :

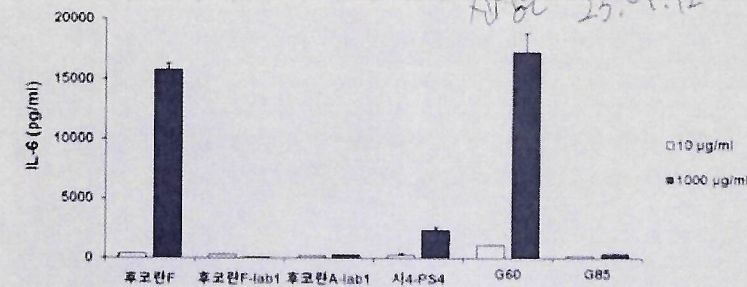
신상영 23.01.12

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 원상분리로 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

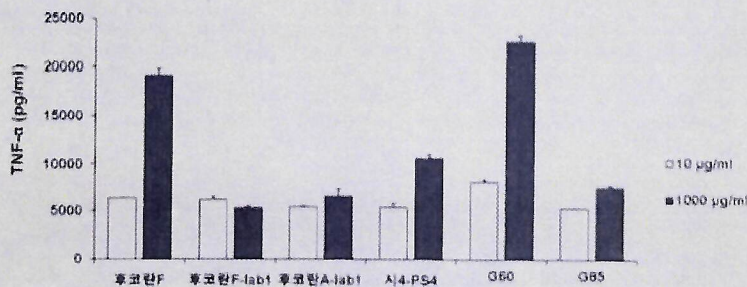
Exp. Methods : P.3 과 동일

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

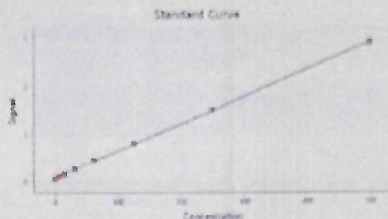
Project Code _____

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:

$$a = 0.00596481$$

$$b = 0.0880575$$

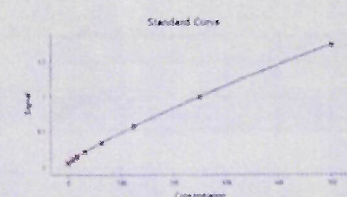
$$R^2: 0.999$$

HSC 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	14.5135580

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	170.59	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. _____

HSC

Date. _____

23.01.12

CONFIDENTIAL

9

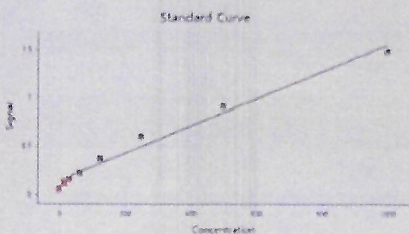
Project Code _____

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	639.900	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.

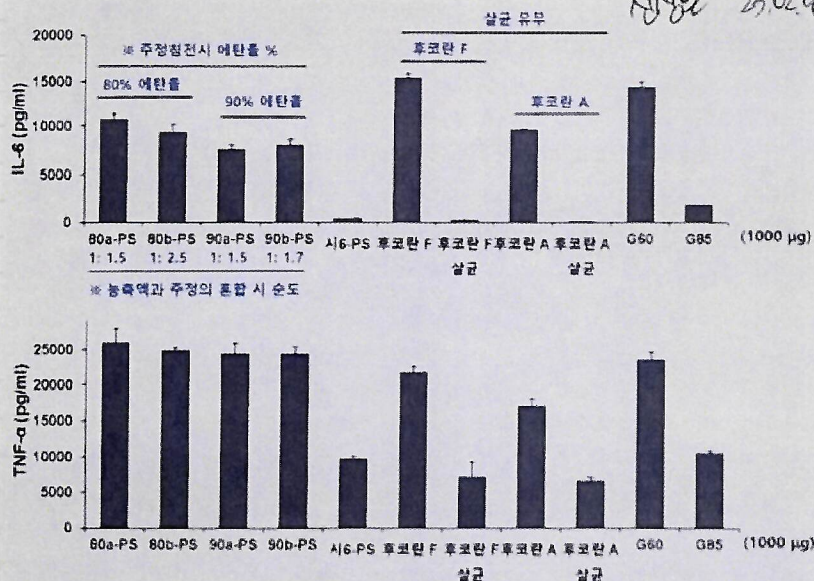
Materials :

신상원 23.02.08

	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 와 동일

Results



• 주정 침전시 80% 에탄올이 90% 에탄올 보다 활성이 높거나 같지는 않음.

• 농축액과 주정의 함량 시 실험 차이에 따른 활성 차이는 있음.

• 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

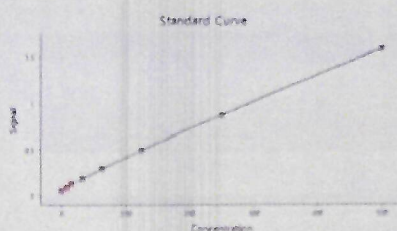
Title

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

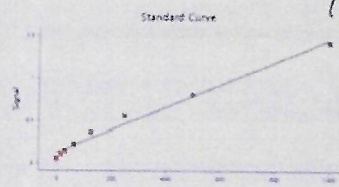
$$y = 1.63593E+06 + (0.0570605 - 1.63593E+06) / (1 + (x/2.94742E+09)^{0.890558})$$

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

	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

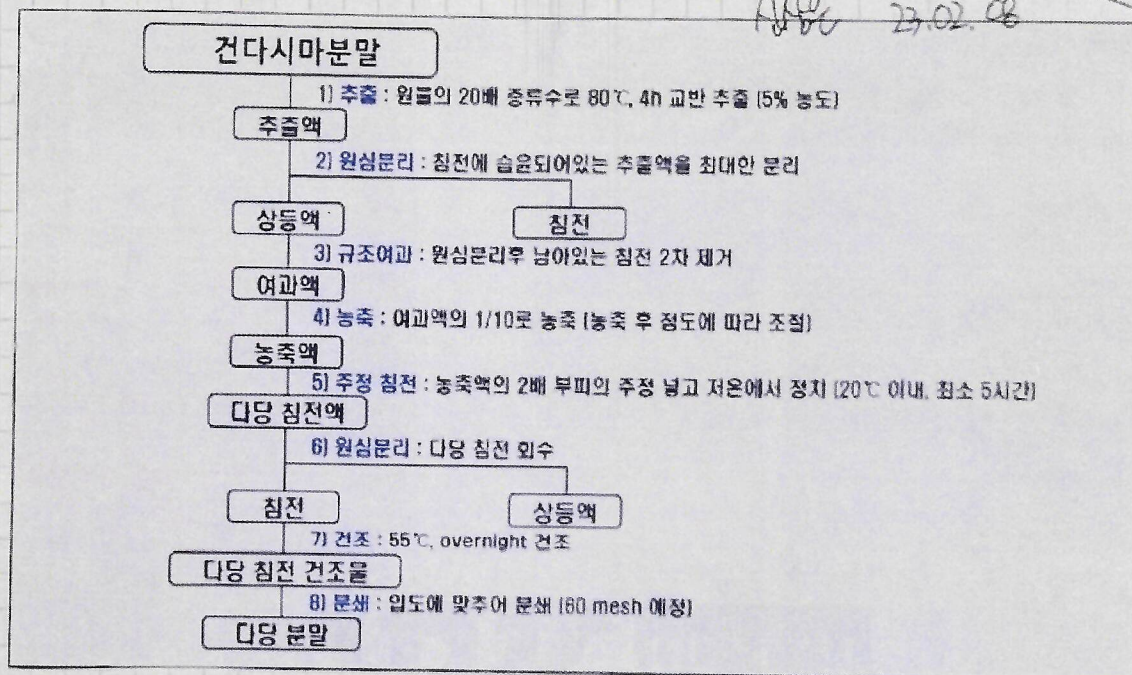
Date.

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 용동 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) 배아플라 (F-PS, P-PS)

3) 다당 옥산 (F-PS, P-PS)

→ 모든 시료는 1mg/ml 이 도중에 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,
QM 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 (%) = $\frac{(A_{sample} - A_b) / (A_c - A_b)}{(A_c - A_b)} \times 100$
 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 _____

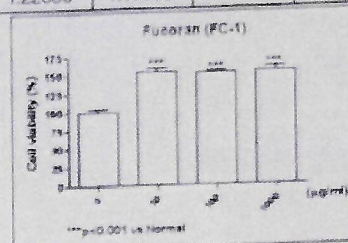
Title _____

From Page No. _____

Results:

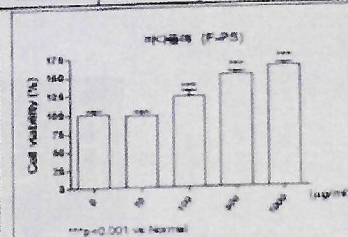
Fucoran (FC-1)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10µg/ml	1.4213	1.367	1.3197	1.3509		1.22808	1.17378	1.12548	1.15768	1.17150
100µg/ml	1.3705	1.365	1.3382	1.3333		1.17728	1.17178	1.14498	1.14008	1.15853
1000µg/ml	1.3005	1.4133	1.3633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



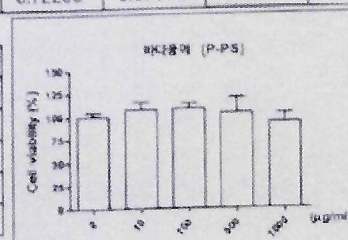
바다풀에 (F-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10µg/ml	1.3941	1.3588	1.2392	1.2837		1.20088	1.16558	1.04598	1.09048	1.12573
100µg/ml	1.2696	1.4354	1.3849	1.3589		1.07638	1.24218	1.19168	1.16568	1.16898
500µg/ml	0.9503	1.0684	1.1004	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 _____

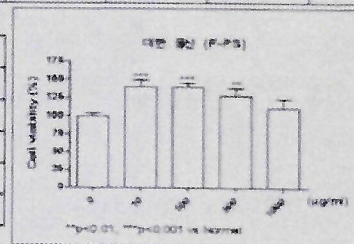
Title _____

From Page No. _____

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

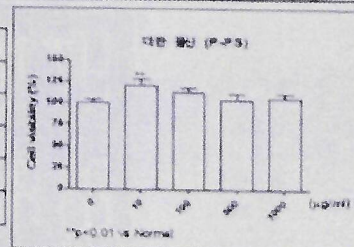
대한물산 (F-PS)	O.D				BK	O.D-BK				Average
0	0.9467	0.9976	0.9539	0.9196	0.1932	0.75348	0.80438	0.76068	0.72638	0.76123
10 $\mu\text{g/ml}$	1.1827	1.3463	1.2322	1.2830		0.98948	1.15308	1.03898	1.08978	1.06783
100 $\mu\text{g/ml}$	1.2286	1.3222	1.2587	1.2222		1.03538	1.12898	1.06548	1.02898	1.06470
500 $\mu\text{g/ml}$	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 모두 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 세포독성 없음.
 F-PS의 경우 세포가 증식하는 경향을 보임.

시상문 23.03.08

To Page No. _____

Witnessed by _____

Sign. *S. Kim*

Date. _____

Recorded by _____

Sign. *시상문*Date. *23.03.08*

Project Code _____

Title _____

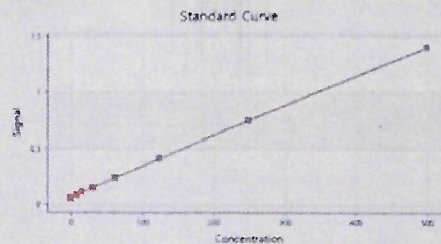
From Page No. _____

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.

S. Kim

Date.

Recorded by

Sign.

시작일

Date.

23.03.08

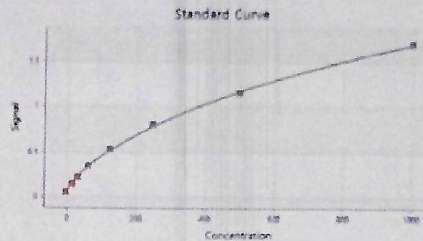
Project Code _____

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

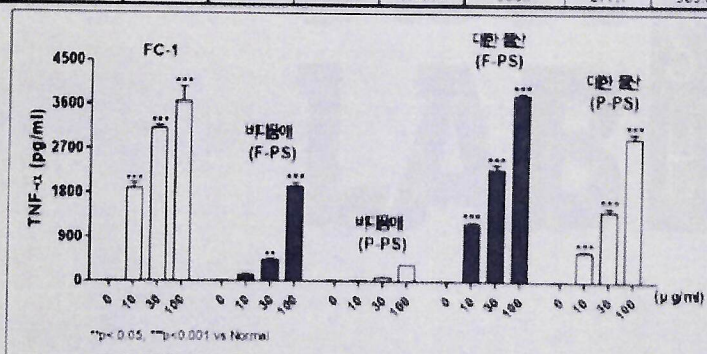
d = 5.90745

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)

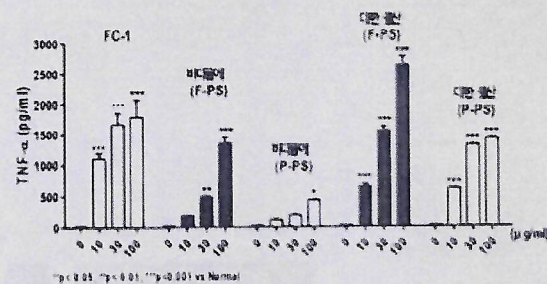
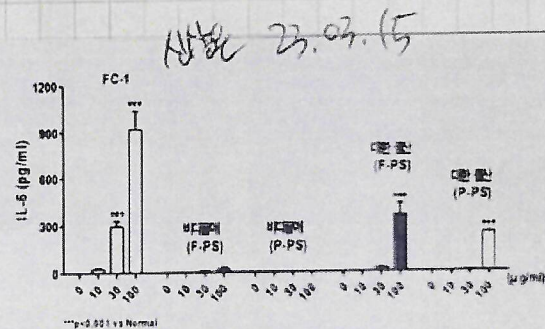
Material/S : P.3 과 동일

Exp. Methods : P.3 과 동일

Results :



원재료	절단 형태	수율 (%)	Fucose 함량 (%)	M. Acid 함량 (%)
대항물산 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) 전담했을 때 powder에 (P-PS) 비해 수율은 낮아지지만 맛과 향은 좋아지고 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. _____

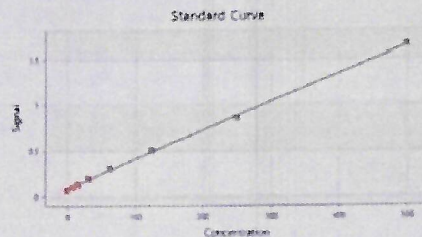
Results

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

또한 대산물산의 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. _____

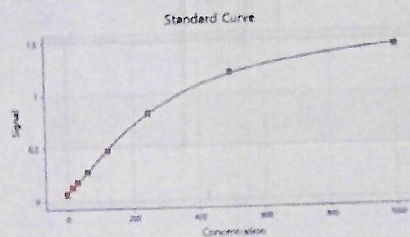
Results

: 1차 실험 결과에 대한 재현실험임.

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

생성 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
대항물질 (F-PS)	10	0.5496	0.4586	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
대항물질 (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

이러한데, 대항물질 시료 중 F-PS와 P-PS보다 TNF- α 생성이 많이 되었으나,바다풀에 시료보다 대항 물질 시료의 TNF- α 생성이 높음.또한 대항물질의 F-PS는 FC-1 보다도 높은 TNF- α 생성을 보임.

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

S. Kim

Date.

Recorded by

Sign.

S. Kim

Date.

23.03.15

Project Code _____

Title _____

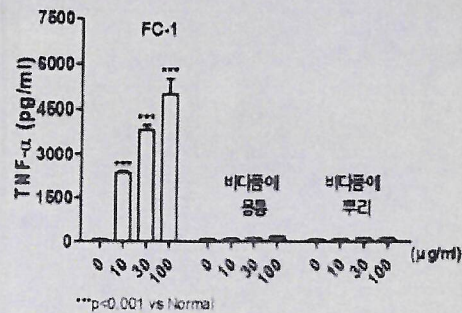
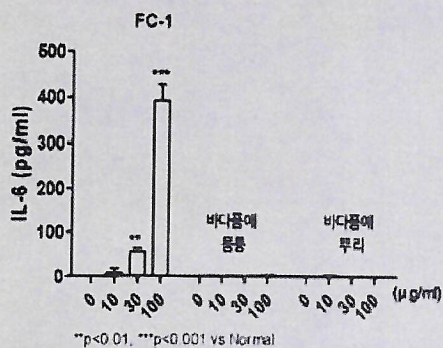
From Page No. _____

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 _____

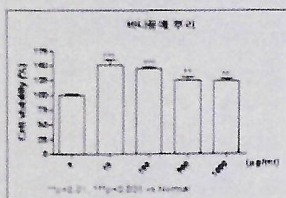
From Page No. _____

Results:

신용 23.03.22

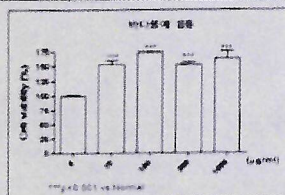
바다물배 뿌리

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											



바다물배 동충

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. _____

Suk Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

신용

Date. _____

23.03.22

Project Code _____

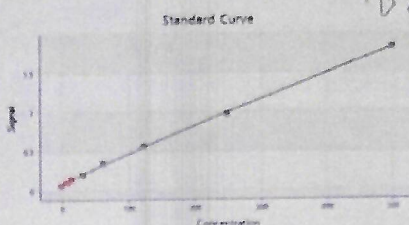
Title _____

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:

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

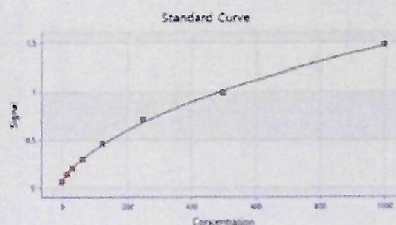
$$y = 2.15151E+06 + (0.0665936 - 2.15151E+06) / (1 + (x/2.30762E+09)^{0.914459})$$

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

	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	106.80	106.80	2.91

To Page No. _____

Witnessed by

Sign. Su Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. AK LeeDate. 23.03.22

Project Code _____

Title 대하 물산 (대방) Fucaran 중개발 연구

From Page No. _____

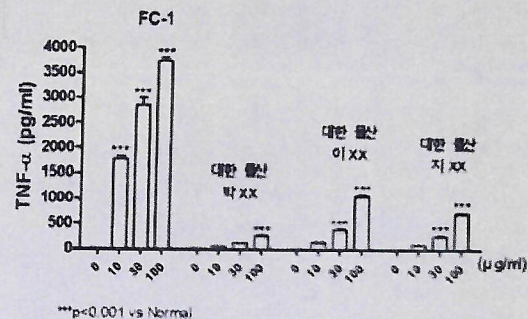
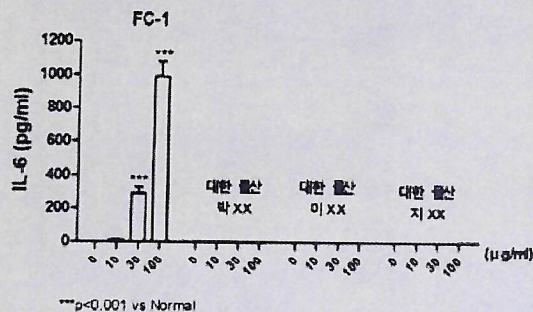
Subject : 대하물산 생상자별 대하 추출물의 면역활성 평가

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 _____

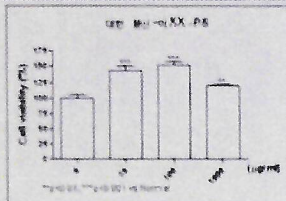
Title _____

From Page No. _____

Results

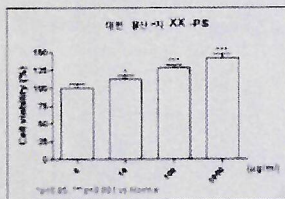
대한물산-이린재-PS

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											



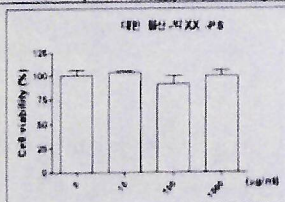
대한물산-지명철-PS

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 박 XX 를 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 _____

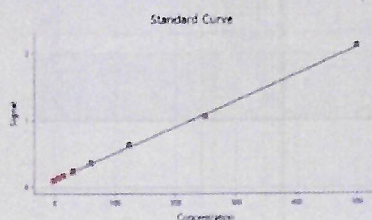
Title _____

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
	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	1.937100
	30	1.098	1.361	1.327	250.6	316.5	307.9	250.6	316.5	307.9	291.67	35.82378
	100	1.546	1.391	1.307	362.9	323.9	302.8	1088.7	971.7	908.4	989.60	91.47311
대한물산-박xx	10	0.09493	0.08550	0.1024	< Min	< Min	0.8405	0.00	0.00	0.00	0.00	0
	30	0.08521	0.08823	0.09211	< Min	< Min	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0
	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
	30	0.08433	0.09460	0.1042	< Min	< Min	1.294	0.00	0.00	0.00	0.00	0
	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
	30	0.1128	0.1004	0.08000	3.454	0.3451	< Min	0.00	0.00	0.00	0.00	0
	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 _____

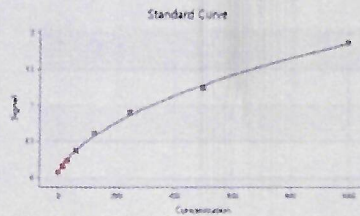
From Page No. _____

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

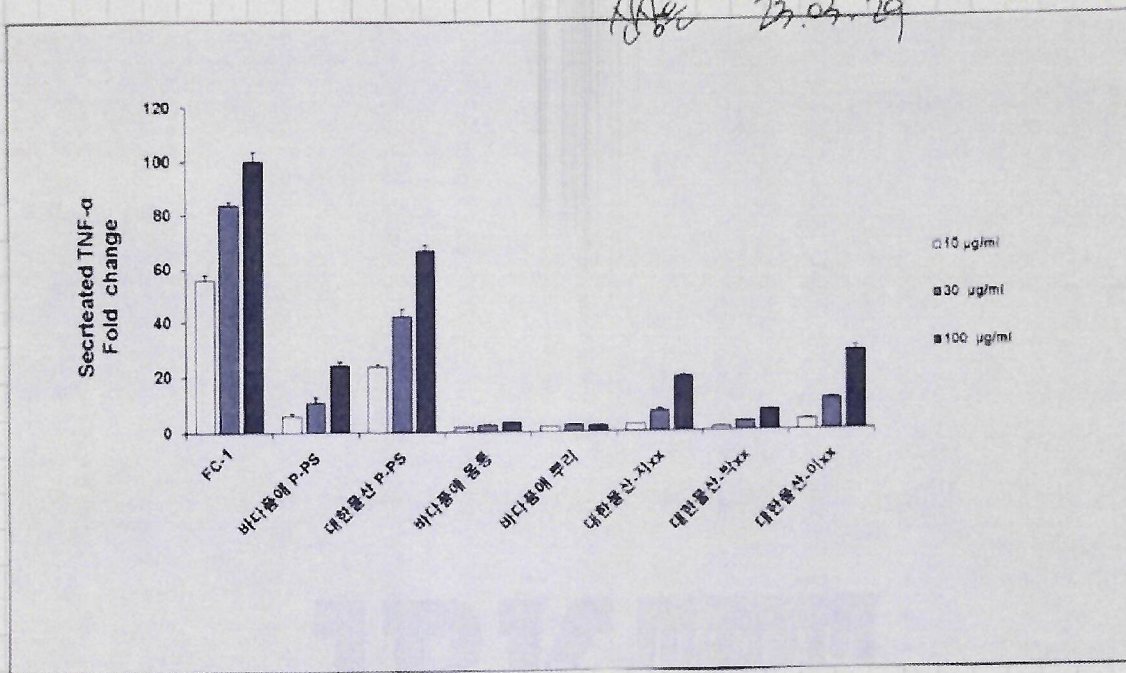
Project Code _____

Title _____

From Page No. _____

P. 13 -27 대외타 요약

서상원 23.03.29



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

To Page No. _____

Witnessed by

Sign.

Kim

Date.

Recorded by

Sign.

서상원

Date.

23.03.29

Project Code _____

Title 대사 유래 (다당) Fucoran 공중 제형 연구

From Page No. _____

Subject : 배치별 지표성분 함량 및 활성평가

Materials : Fucoran 1

Fucoran 2

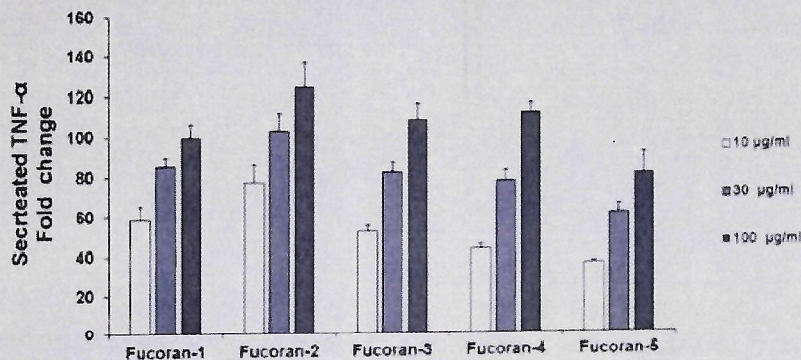
Fucoran 3

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. 김영민

Date. _____

Recorded by _____

Sign. 생남원Date. 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

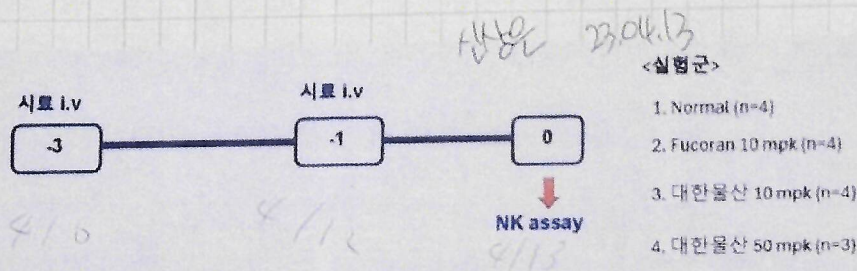
EDTA는 Sodium 이 들어있는 제품을 사용하든 됨

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. _____

상사마

Date. _____

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 마려당 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 >

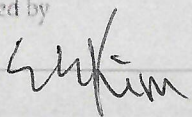
- ① 상등액을 첨가한 제퍼라고 beket 에 160 셀 의 buffer 를 넣음.
(바탕 1개 40 셀 기준)
- ② 40 셀 의 NK cell biotin - antibody cocktail 을 첨가함. (바탕 1개 10ml 기준)
- ③ 호일로 갇힌 후 5분간 ice 에 방치. (양실, 2-8°C or ice 에 방치함)
- ④ 8ml 의 buffer 를 넣고 1800 rpm 에서 8분, 4°C 원심분리 후 상등액 제거. (바탕 1개 buffer 2ml 기준)
- ⑤ 상등액 제거하고 320 셀 buffer 를 첨가함. (바탕 1개 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)

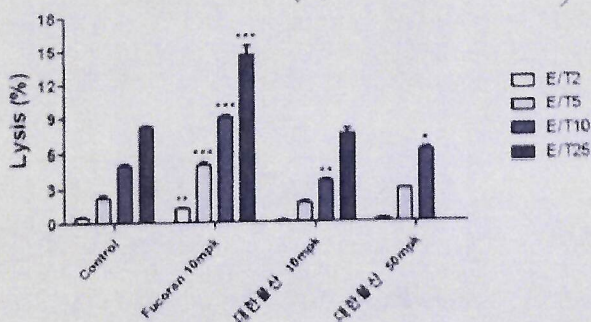
3. LDH kit protocol (Doogen, cat. DG-LDH 500) 이 따라 YAC-1 (high control), background (배지만 있는 well) 에 lysis buffer 20 μ l 넣고 pipetting 후 5분동안 방치 $\rightarrow$ 흡입물리 후 20 μ l 연음

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(%) = $(A - B - C) / (D - B) \times 100$

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.H. Kim

Date. _____

Recorded by

Sign. _____

S.H. Kim

Date. _____

23.04.13

Project Code _____

Title 나시타 유래 (지상) Fucoran 공동 개발 연구

From Page No. _____

Subject : 약용 특이 효 활성제의 폐 전이 억제 효능 확인

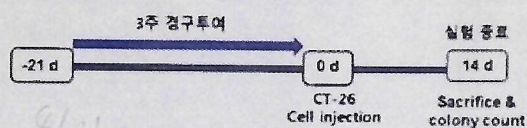
Materials : Fucoran,

CT26

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

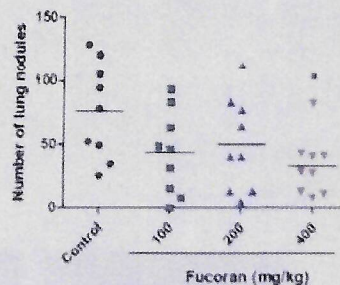
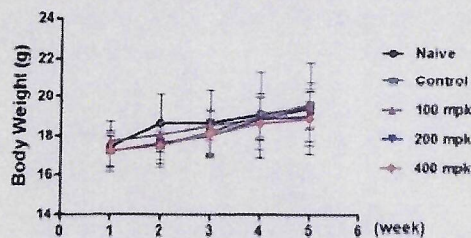
Exp. Methods : 혈관을 농도별로 각각동안 정맥 투여한 후 CT-26 세포를
대정맥으로 투여하고 14 일 뒤 폐에 정해진 콜로니를 확인함.

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. _____

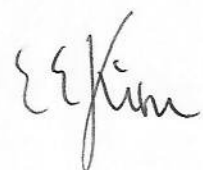
23.05.22

연구보고서

다시마 유래 FucoranTM의 공동 개발 연구

연구기간 : 22.08.21~23.07.20

김의신 박사



과제 요약문

연구의 목적 및 내용	최근 감염병의 유행 이후 질병 예방과 건강 유지를 위한 면역 조절제에 대한 수요가 증가하였고 개발되었으나 독성이 낮고 넓은 치료 스펙트럼을 가진 천연물 소재의 식물 영양소 개발을 위해 자사는 후코이단 다시마 추출물을 해원을 통해 수급하고 있었으나, 김의신 박사의 자문을 통해 자사에서 독립적으로 생산 가능한 고품유 후코이단 다시마 추출물을 기능성 원료로 개발하고자 함. 면역 활성을 증대시킬 수 있는 추출 공정 및 원료 선정하고 선정된 원료의 동물 실험 모델에서 항전이 효능 및 NK 세포 활성 효능을 규명하고자 함.		
연구개발 성과	1. 후코이단 고품유 다시마 추출물의 최적 추출 공정 및 원료 선정을 통한 후코란 도출 ◦ In vitro 면역 활성 평가를 통해 생산 공정을 고려한 공정도 확립 ◦ 도출된 공정도로 제조된 생산지별 원료의 면역 활성을 통한 최종 후코란 도출 2. 후코란 표준화 검증 ◦ lot별 후코란 면역 활성 및 지표성분 함량 분석을 통한 표준화 검증 3. 후코란 효능 평가 ◦ 동물 모델에서 자연살해세포 (NK cell)의 종양세포 살해능 평가 ◦ 동물 모델에서 마우스 폐전이 모델을 이용한 항 전이 효능 평가		
활용 계획	◦ 암환자의 관리에 대한 주요한 소재 개발 가능성 확보 ◦ 천연소재와 항암제 병용투여의 항암과 관련한 융합적 발전 ◦ 시아플렉스 애플 홍보자료 활용 ◦ 인체적용시험용 시제품 개발 ◦ 인체적용시험 프로토콜 개발 ◦ 인체적용시험 IND 승인		
국문 핵심어	다시마 추출물	면역활성	자연살해세포 활성
	항전이		

I. 연구개발 과제의 개요

1. 연구과제 최종목표

암 관련 피로는 암의 발생과 함께 나타나거나 치료 과정에 생기는 여느 때와 다른 지속적인 피로감으로 정의되고, 이러한 암 관련 피로는 암의 치료를 방해하고, 최종적으로는 암 환자의 생존율을 낮추는 주요 원인으로 알려져 있음. 본사는 이러한 암 관련 피로를 해결하기 위해 단독 또는 항암제와 병용투여가 가능한 암 피로 개선 식품을 개발하고자 함. 이에 대한 아로니아+후코란 (후코이단) 나노컴플렉스 개발에서 후코란의 추출공정 및 효능평가를 통해 임상적 활용에 적합한 후코란 개발논리를 확립하고, 최종적으로 인체 적용시험을 위한 시제품 생산을 목표로 함.

2. 연구과제 추진 체계

○ 기업과 김의신 박사의 유기적인 협력관계로 조기 목표 달성: 제이비케이랩에서 다시마에서 추출되는 유효성분인 후코이단의 함량을 늘리고, 세포 및 동물 실험을 통해 그 효능을 평가함. 김의신 박사는 이러한 추출공정 및 효능평가에 대하여 임상적인 관점에서 접근하고 논의하여, 보다 더 명확한 개발 논리를 확보함.



목표 1. In vitro 면역활성 평가를 통한 후코이단 고함유 다시마 추출 공정 확립

- 대식세포에 각 공정에 따라 제조된 다시마 추출물을 24시간 처리.
- 세포 생존을 확인을 통한 독성 유무 판단.
- 사이토카인 (IL-6, TNF-α) 측정을 통한 면역 활성 평가.

목표 2. In vitro 면역활성 평가를 통한 다시마 원료 선정

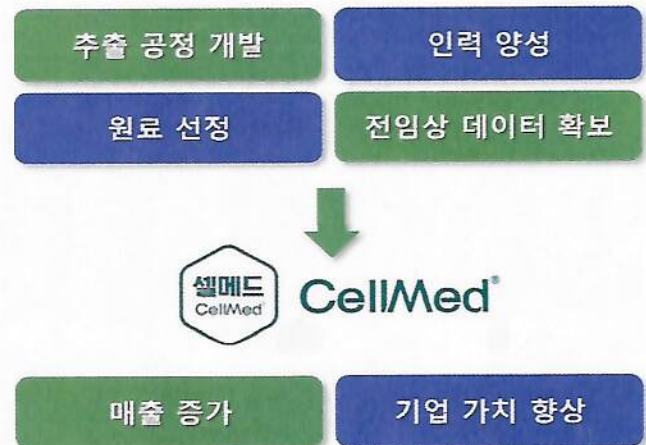
- 대식세포에 확립된 후코란 추출 공정 방법으로 생산된 생산지별 다시마 시료를 24시간 처리.
- 세포 생존을 확인을 통한 독성 유무 판단.
- 사이토카인 (IL-6, TNF-α) 측정을 통한 면역 활성 평가

목표 3. In vitro 면역활성 평가 및 다시마 추출물의 지표 성분 분석을 통한 후코란 원료 표준화

- 확립된 공정에 따라 생산지별 다시마 시료의 면역 활성 평가에서 우수한 효능을 보이는 원료를 선별하여 후코란으로 명명.
- 여러 lot의 후코란을 제조하고 면역 활성 평가 및 지표성분 분석을 통한 원료 표준화 확인.

목표 4. In vivo 동물모델에서 후코란 효능 평가

- 후코란 정맥 투여를 통한 자연살해세포 (NK cell)의 종양세포 살해능 평가.
- 후코란 경구 투여를 통한 종양세포에 대한 항전이 활성 평가.



II. 연구 수행내용

1. 후코이단 고함유 다시마 추출 최적화 확립

가. 다시마 추출 공정에 따른 면역활성 확인

(1) 추출 공정별 다시마 추출물에서 시료의 면역 활성 효능 평가

해원의 공정도를 참고하여 자사에서 고함유 다시마 추출물의 최적화 조건을 잡기 위해 시료를 제조하고 대식세포에 (RAW264.7 세포) 24시간 처리 후 분비된 사이토카인 측정을 통한 면역 활성을 확인하였음.

- 방법 : 대식세포 유래 세포주 RAW 264.7 cell로부터 사이토카인의 분비능을 측정하기 위하여 2.5×10^5 cells/mL로 세포 수를 조정하여 48 well plate에 250 μ L씩 가한 뒤, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였음. 그 후, DMEM media를 이용하여 다양한 농도로 희석한 후코란을 대식세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였음. 배양을 마친 후 plate를 원심분리 (900 rpm, 5 min) 하여 상등액을 취한 후 sandwich ELISA kit를 이용하여 시료의 자극에 의해 대식세포로부터 배양 상등액에 분비된 IL-6, TNF- α 의 함량을 측정 하였음.
- 결과 : 시4-PS1 (9.4 brix) > 시4-PS2 (10.2 brix) > 시4-PS3 (14.8 brix)로 brix에 따른 면역 활성은 큰 차이 없었음. 또한 다당침전 생성 후 100mesh로 여과 시 통과한 침전 (시4-PS4-침전) 이 mesh에 걸린 침전 (시4-PS4)보다 면역 활성이 좋았음 (그림1).

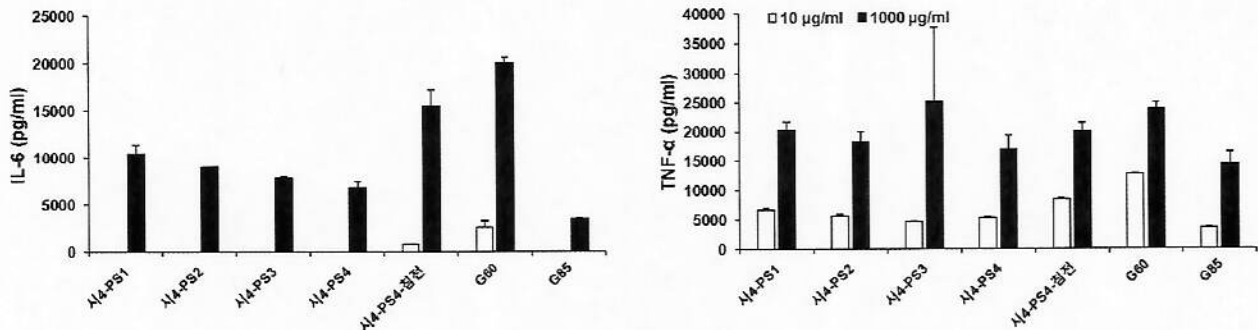


그림 1. 농축액의 brix 및 다당 침전에 따른 면역 활성 비교

- 결과 : 주정 침전시 80% (80a-PS, 80b-PS) 에탄올이 90% (90a-PS, 90b-PS)에탄올보다 활성이 좋으나 큰 차이는 없었으며 농축액과 주정의 혼합 시 순도 차이(80a-PS=1:1.5, 80b-PS=1: 2.5)에 따른 활성 차이는 없었음 (그림2).

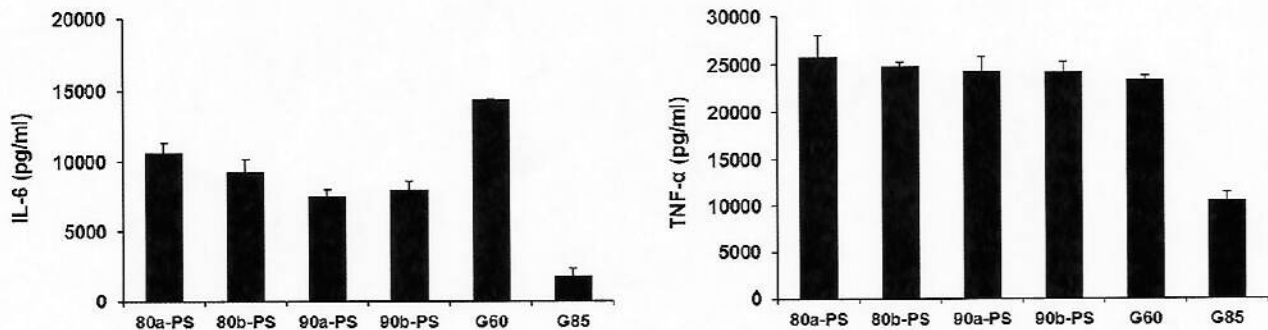


그림 2. 에탄올과 주정 혼합에 따른 활성 평가

- 결과 : In vitro 면역 활성 평가를 통해 생산 scale의 공정도가 도출됨 (그림3).

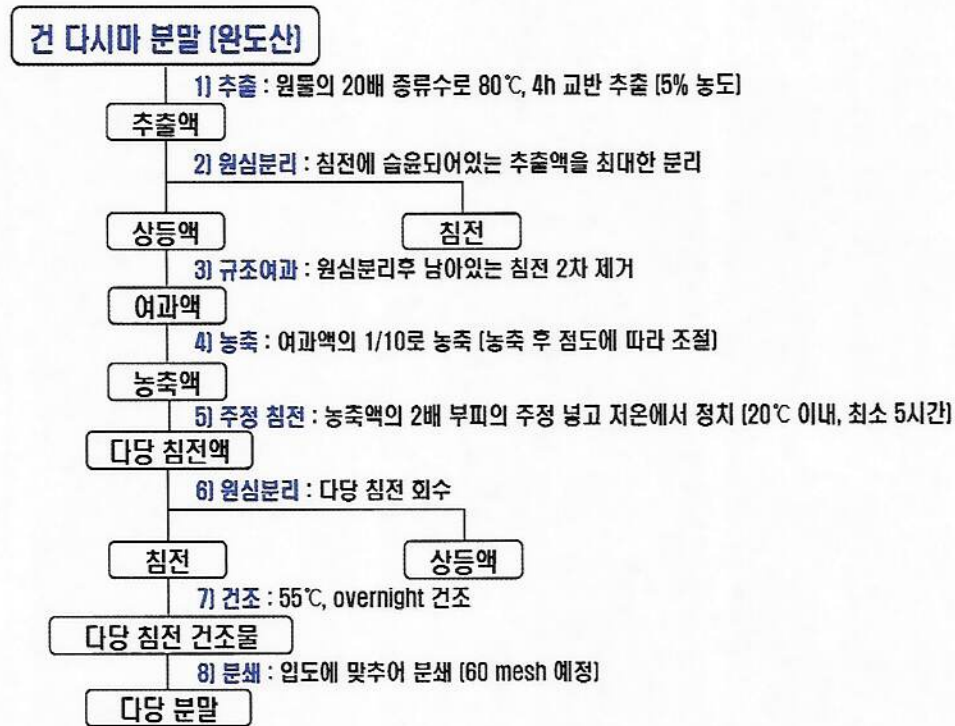


그림 3. 후코란 생산의 최종 공정도

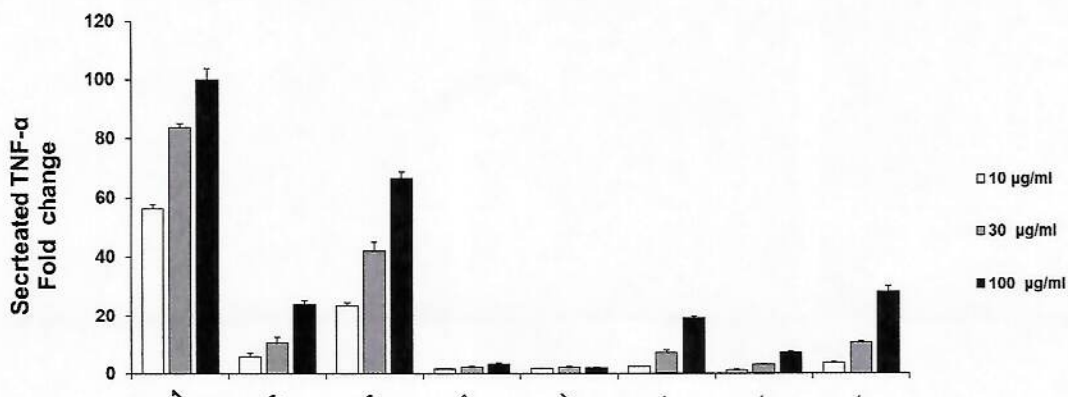
2. 후코이단 고함유 다시마 원료 선정

가. 다시마 원료에 따른 면역활성 확인

(1) 원산지별 다시마 원료 추출물에서 시료의 대식세포의 면역 활성 효능 평가

원산지별 다시마 원료의 면역 활성 평가를 통해 활성이 우수한 원료 선정을 위해 도출된 공정 방법으로 제조된 시료를 대식세포에 (RAW264.7 세포) 24시간 처리 후 분비된 사이토카인 측정 하였음.

- 방법 : 다시마 추출 최적화를 위한 in vitro 면역 활성 실험방법과 동일함.
- 결과 : 원산지별 면역 활성 평가를 통해 맑은들의 다시마 원료가 우수한 면역활성을 나타냄. 맑은들 원료로 자사 공정에 의해 제조된 다시마 추출물을 후코란으로 명명함 (그림4).



3. 후코란 표준화 검증

가. Lot별 후코란의 면역활성 평가

5개 lot의 후코란을 제조하고 대식세포에 (RAW264.7 세포) 24시간 처리 후 분비된 사이토카인을 측정하였음.

- 방법 : 다시마 추출 최적화를 위한 in vitro 면역 활성 실험방법과 동일함.
- 결과 : 총 5개 lot의 후코란의 면역 활성을 확인한 결과 20% 표준편차 범위에서 비슷한 수준의 면역 활성이 확인됨 (그림5).

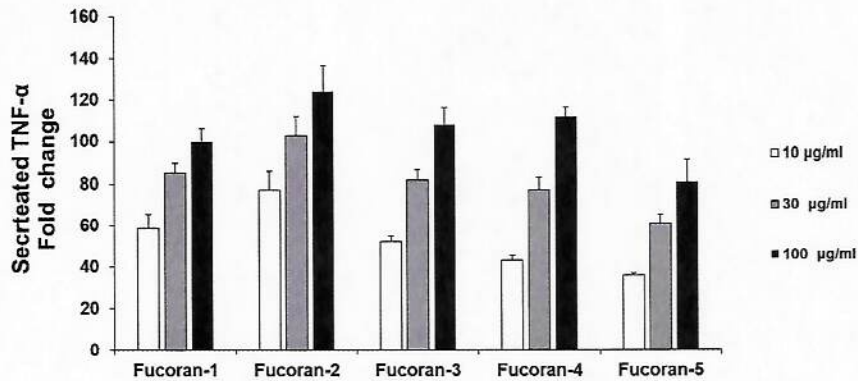


그림 5. Lot별 면역활성 평가를 통해 후코란 표준화 검증

나. Lot별 다시마 추출물의 지표 성분 확인

5개 lot의 후코란을 제조하고 지표 성분 분석을 하였음.

- 방법 : 후코란의 구성당 조성을 확인하고자 시료에 2 M trifluoroacetic acid (TFA)를 1mL 가한 후 120°C에서 1시간 30분 동안 반응시켜 단당의 형태로 가수분해 한 뒤 heating mantle (50°C) 을 사용하여 건조하였음. 그 후 0.3 M NaOH를 이용하여 시료를 재 용해한 뒤, 염기 조건 하에서 0.5 M 1-phenyl-3- methyl-5-pyrazolone (PMP) (dissolved in methanol)를 120 µL 가하여 70°C에서 60분 동안 반응하였음. 이어서 0.3 M HCl을 이용하여 중화한 뒤 완전히 건조하여 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리 하여 H₂O 층만을 회수하고 여과한 후 HPLC로 분석하였음.
- 결과 : 총 5개 lot의 후코란의 면역 활성을 확인한 결과 20% 표준편차 범위에서 비슷한 수준의 면역 활성이 확인됨 (그림6).

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

그림 6. Lot별 지표성분 함량 분석을 통한 후코란 표준화 검증

4. 동물모델에서 후코란 효능 검증

가. 정맥 투여를 통한 자연살해세포 (NK cell)의 종양세포 살해능 평가

NK cell은 체내 림프구의 약 5-10%를 차지하며 virus와 bacteria같은 비자기(non-self) 인자뿐만 아니라 감염세포, 노후세포, 및 종양세포에 대한 사멸효과를 갖는 것으로 알려져 있음. 따라서 후코란을 정맥 투여하여 시료에 의한 NK 세포의 활성화에 의한 종양 세포 살해 효과를 확인하였음.

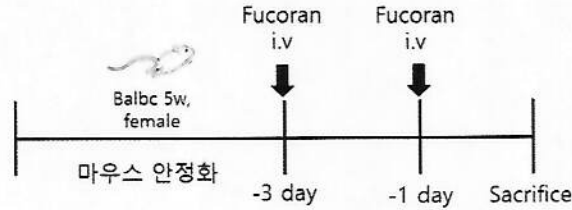


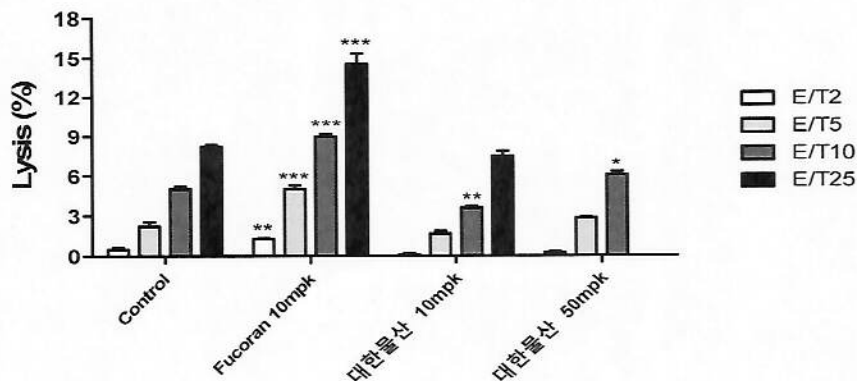
그림 7. 후코란 정맥 투여 모델 실험 스케줄

- 방법 : 후코란을 PBS에 용해하여 10mg/kg로 제조한 뒤, BALB/c (6 weeks, female) 마우스 실험 진행 3일 전, 1일 전에 정맥투여하였음. 실험 당일에는 CO₂ gas를 이용해 마우스를 처사 한 후, 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였음. 그 후, stainless steel mesh 및 PBS를 이용하여 비장을 파쇄 및 여과하여 총 비장 세포를 획득하였음. 이후 NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 제조사의 지침에 따라 사용하여 NK cell만을 선택적으로 분리 하고 이를 effector cell로 사용하였음. 그 후 major histocompatibility complex (MHC) class I이 결여되어 NK cell에 대한 감수성이 높은 것으로 알려진 림프종 유래 세포주 YAC-1을 target cell로 사용하였음. Effector cell은 target cell과의 비율(E/T ratio)이 2.5:1, 5:1, 10:1이 되도록 96 well plate에 조정하여 분주하였음. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양한 후 effector cell의 종양세포 살해능에 의해 target cell로부터 유리되어 나오는 lactate dehydrogenase (LDH)의 발생량을 EZ-LDH (Dogen)를 사용하여 측정하였으며 NK cell의 종양세포 살해능 지표 물질인 LDH는 다음 식을 이용하여 계산하였음 (그림7).

NK cell activity(%)

$$= [(experimental-effector spontaneous)/(target maximum-target spontaneous)] \times 100$$

- 결과 : 정맥 투여한 후코란 실험군은 PBS만 투여한 대조군에 비해 NK cell 종양세포 살해효과가 약 1.8배 증가한 것으로 확인되었음. 대한물산 시료 투여에 의한 NK 활성을 거의 보이지 않았으며 이는 in vitro 면역 활성 결과와 동일한 결과를 보여줌 (그림8).



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

그림 8. 후코란 정맥 투여를 통한 자연살해세포의 종양세포 살해능 평가

나. 마우스 폐전이 모델을 이용한 항전이 효능 평가

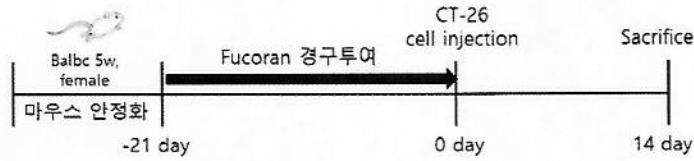


그림 9. 후코란 정맥 투여 모델 실험 스케줄

- 방법 : 경구 투여에 의한 시료의 항전이 활성 평가는 폐(lung)에 대한 고전이 특성을 나타내는 종양 세포주인 CT-26 세포를 이용하였음. 후코란을 PBS에 용해하여 농도별 (100, 200, 400 mg/kg)로 제조한 뒤, BALB/c (6 weeks, female) 마우스에 28일 동안 1일 1회 경구투여하였음. 이후, CT-26 을 4×10^5 cells/mL로 조제하여 마우스당 4×10^4 cells의 농도로 정맥 투여하였으며, 종양 세포 접종 14일 후 마우스 치사시켜 종양세포의 표적기관인 폐를 적출하고 Bouin's solution (Sigma)에 전이된 종양을 고정시킨 후, 형성된 암세포를 계수함으로써 항전이 활성을 평가하였음 (그림9).
- 결과 : 후코란 투여 기간 동안 대조군과 비교하여 체중변화는 없었으며, 암세포만 투여한 실험군과 비교하여 후코란 400 mg/kg 투여 그룹에서 콜로니 수가 유의적으로 약 58% 감소하였음 (그림10).

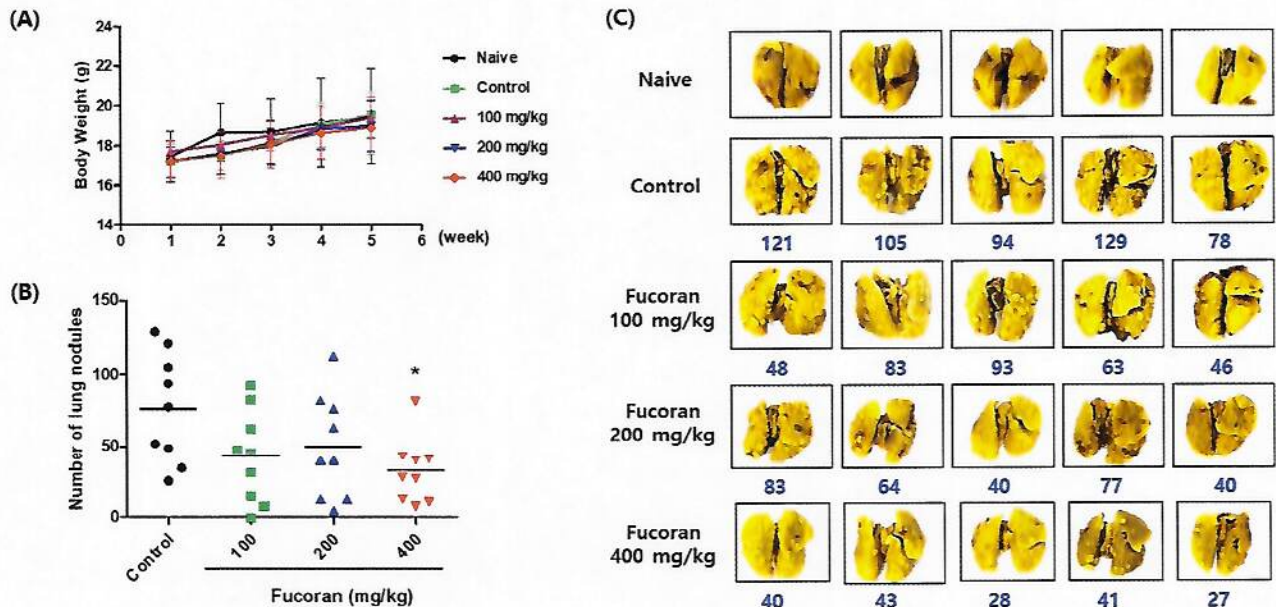


그림 10. 후코란 경구 투여를 통한 항전이 효능 평가

III. 연구개발성과 및 활용 계획

- 암환자의 관리에 대한 주요한 소재 개발 가능성 확보
- 천연소재와 항암제 병용투여의 항암과 관련한 융합적 발전
- 시아플렉스 에프 홍보자료 활용
- 인체적용시험용 시제품 개발
- 인체적용시험 프로토콜 개발
- 인체적용시험 IND 승인