

## Enzymatic Synthesis of 1, 2-Hexanediol Galactoside by Whole Cells of $\beta$ -Galactosidase-containing Recombinant *Escherichia coli*

Yi-Ok Kim and Kyung-Hwan Jung\*

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

Received January 21, 2016 / Revised February 23, 2016 / Accepted March 28, 2016

Recently, it has been reported that some preservatives used in cosmetics lead to skin problems. Among the many cosmetic ingredients, 1, 2-hexanediol (HD) is used as both a preservative and humectant. In order to develop safer ingredients, we studied the synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside (HD-G) by a transgalactosylation reaction using  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal)-containing recombinant *Escherichia coli* cells. The transgalactosylation reaction was carried out under high-lactose conditions for 24 hr. After 12 hr had elapsed, a new spot was identified by thin-layer chromatography (TLC) analysis, and we presumptively designated this new spot as HD-G. Then, we carried out the purification of the presumptive HD-G spot from the reaction mixture by using silica gel chromatography, and its mass was measured by electrospray ionization-mass spectrometry. The purified new spot on the chromatograph was identified a sodium adduct ion ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z = 303.1423$ ) of HD-G. In addition, when purified HD-G was hydrolyzed using commercially available *E. coli*  $\beta$ -gal, it was observed that a galactose molecule was released from HD-G. That is, it was demonstrated that HD-G is a galactoside derivative of HD. Finally, we confirmed that HD-G was enzymatically synthesized by *E. coli*  $\beta$ -gal as a new molecular entity. In the future, we plan to determine the minimum inhibitory concentrations of HD-G against different bacterial species. The cytotoxicity of HD-G against human skin cells will also be examined. It is expected hopefully that the galactosylation of HD would improve the functionality of HD-G.

**Key words** : 1, 2-Hexanediol,  $\beta$ -Galactosidase, cosmetic preservative, *Escherichia coli*, transgalactosylation

### 서 론

최근 화장품 산업에서 첨가물 중의 하나인 방부제(살균/보존제)에 대한 부작용 문제가 대두 되고 있으며[14, 15], 그러한 이유로 방부제가 첨가되지 않은 화장품들에 대한 관심이 높아지고 있고, 방부제에 대한 대체물 연구도 활발히 이루어지고 있다[3,10]. 본 연구팀에서도 화장품에 사용하는 방부제인 chlorphenesin (CPN) [11]과 phenoxyethanol (PE) [7]의 부작용을 감소 시킬 목적으로 galactoside 유도체 합성과 기능성 변화에 대한 연구를 수행하여왔다. 피부세포에 대한 독성을 감소시키기 위한 방법으로 CPN과 PE에 한 분자의 galactose를 결합시킨 유도체를 합성하는 방법을 사용하였으며, 이 합성 반응은 효소  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal)에 의해서 고농도의 lactose가 녹아있는 수용액상에서 일어나는 transgalactosylation 반응으로 알려져있다.

본 연구에서는 화장품 소재로서 보습력과 방부력을 가지고 있는 1, 2-hexanediol (HD)의 transgalactosylation 반응에 대하여 조사하였다. HD는 분자량이 118.17이고, 6개의 carbon chain의 1번, 2번 탄소에 hydroxyl group (-OH)를 갖고 있는 구조(Fig. 1A)로 물에 대한 용해도가 매우 높아서, 물 또는 알코올에 잘 섞이는 것으로 알려져 있다. HD는 현재 화장품의 방부제로 유아용품, 목욕용품, 모발, 피부 등에 사용되는 화장품과 개인 미용 및 위생용품 등에 1-2%의 농도로 사용되어지고 있다. 현재까지의 연구 보고에 따르면 1, 2-alkanediol의 alkyl chain의 길이가 길어질수록 세포막이 파괴 능력이 좋아져서 독성이 높아지는 것으로 알려져 있다. 또한, 몇 가지의 1, 2-alkanediol을 혼합하여 사용하였을 때, 피부에 대한 독성이 보고되어있다[5, 9].

본 연구에서 transgalactosylation 반응을 통하여 1, 2-hexanediol galactoside (HD-G)를 합성하였는데, 이 때,  $\beta$ -gal을 함유하는 재조합 *Escherichia coli* (*E. coli*)를 이용하여 transgalactosylation 반응을 수행하였다. 재조합 *E. coli*는 이미 본 연구팀의 CPN과 PE의 galactoside 합성연구에 사용하였으며 [7, 11], arabinose에 의해서 induction 되는 *araBAD* promoter 뒤에  $\beta$ -gal 유전자가 이어져 있고, 이러한 재조합  $\beta$ -gal을 함유한 *E. coli* 세포 자체를  $\beta$ -gal의 정제 없이 HD-G 합성반응에 사용하였다. 본 연구에서는 *E. coli*  $\beta$ -gal을 이용하여 HD에

#### \*Corresponding author

Tel : +82-43-820-5246, Fax : +82-43-820-5272

E-mail : khjung@cjnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

transgalactosylation 반응으로 galactose 한 분자가 결합된 HD-G가 합성되는지에 대하여 조사하였고, 또한, HD-G를 정제하여 mass spectrometry로 질량을 분석하였고, 새롭게 galactose 한 분자가 결합한 것을 확인 하는 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

1, 2-Hexanediol은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, TLC (thin-layer chromatography) plate는 Macherey - Nagel (Düren, Germany)의 DC-Fertigplatten SIL G-25 UV<sub>254</sub>를 사용하였다. Silica gel은 Zeochem의 ZEOprep 60 (60-200 μm)을 사용하였고, 가수분해용 β-gal은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였으며, 비교 실험용으로 사용한 효모 유래 β-gal인 Lactozym (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)은 EnzymTech (Yongin, Korea)에서 무상으로 공급하여 주었다.

### β-Gal을 생산하는 재조합 대장균

대장균의 *araBAD* promoter 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/*Myc-His/lacZ* vector (7.2 kb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 *E. coli* MC 1061를 발현 숙주로서 β-gal을 발현하였다. β-gal 유전자는 pBAD/*Myc-His* expression kit의 유전자를 사용하였다. 재조합 *E. coli* 제작과 재조합 β-gal을 함유한 *E. coli*의 배양방법 등에 대하여서는 선행연구에서 자세히 기록하였다[6, 8].

### β-Gal 함유 대장균을 이용한 HD-G 합성

15 ml conical tube에 300 g/l lactose, 1.92 U/ml β-gal (재조합 β-gal을 함유한 *E. coli* 세포로 첨가), 50 mM HD를 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 녹인 후, 전체 부피를 10 ml 되게 한다. 그리고 shaking incubator에서 37°C, 100 rpm으로 12 시간 동안 반응 시켰다. 한편, HD 농도에 대한 HD-G 합성 효과를 조사하기 위하여, HD 농도를 20에서 120 mM까지 변화 시키면서 HD-G 합성을 조사하였다. 비교 실험을 위하여 Lactozym을 이용하여 같은 반응을 실시하였다[1].

### TLC 분석

20×10 cm TLC plate에 1.0 μl 시료를 loading하고 acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v)을 이동상으로 하여 15 분 전개하였다. 그리고 staining solution #1 (1.25 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25 ml 10 % NaOH in 200 ml water) 혹은 staining solution #2 (0.5% α-naphthol, 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol)를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 분간 말려서 spot을 확인 하였다. 정량이 필요할 경우에는 TLC plate 스캔하여 이미지를 얻은

후, AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leonardo, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

### HD-G의 정제

Econo-column (ID: 5 cm, L: 10 cm, maximum vol.: 193 ml; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 20G 주사바늘을 연결하고, column 내에 silica gel을 7 cm 높이로 채우고, 이동상 (acetonitrile : water = 85 : 15, v/v)으로 한번 세척한다. 그리고 이동상이 silica gel의 위로 0.5-1.0 cm 남았을 때, HD-G가 함유된 반응액 8 ml를 loading 한다. 그 후 이동상을 중력에 의하여 연속적으로 흘리면서 35 ml 씩 분획물을 받고, 그 분획물을 TLC로 분석한 후, 그 중 HD-G만 포함된 분획물을 rotary vacuum evaporator을 이용하여 농축하였다.

### HD-G의 질량분석

ESI (electrospray ionization)-mass spectrometer (SYNAPT G2, Waters, U.K)를 이용하여 정제한 HD-G의 질량을 분석하였다.

### β-Gal을 이용한 HD-G의 가수분해

정제된 약 1 M의 HD-G 100 μl와 2 U/ml의 β-gal (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 100 μl를 1.5 ml micro tube에서 섞은 후, 37°C에서 가수분해 반응을 실시한다. 그리고 TLC 분석을 통하여 HD-G에서 유리된 당당류를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

화장품용 방부제로 쓰이고 있는 HD의 transgalactosylation 반응에 대한 연구는 아직까지 보고된 적이 없다. 그래서 이미 수행한 CPN과 PE의 transgalactosylation 반응 연구[7, 11]에서와 같이 고농도의 lactose (300 g/l) 존재 하에서 재조합 *E. coli*의 β-gal을 이용하여 transgalactosylation 반응이 일어날 수 있는지에 대하여 먼저 조사하여 보았다. 이 때, 동시에 상업적으로 판매되고 있는 β-gal인 Lactozym을 이용하여 같은 반응을 실시하여 비교하여 보았다. Fig. 1A에서와 같이 24시간 동안 반응 시켰을 때, 새로운 spot이 12시간 이후부터 반응물에서 생성 되는 것을 TLC로 확인 할 수 있었다. 이러한 새롭게 생성된 spot은 *E. coli*의 β-gal을 사용한 반응물과 Lactozym을 사용한 반응물에서 모두 확인 할 수 있었다. 또한, *E. coli* β-gal을 사용한 반응물을 TLC로 전개 한 후, 당류(sugar)와 반응하여 발색하는 시약으로 염색하여 본 결과 Fig. 1B와 같이 같은 위치에서 새로운 spot을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 *E. coli*의 β-gal을 이용한 transgalactosylation 반응으로 당류가 결합한 새로운 물질(HD-G)이 합성되었을 가능성을 추정하게 하는 결과라 할 수 있겠다. 그리고, HD-G라고 추정할 수 있는 물질의 합성이 HD의 농도 변화에 어떻게 변화하는지

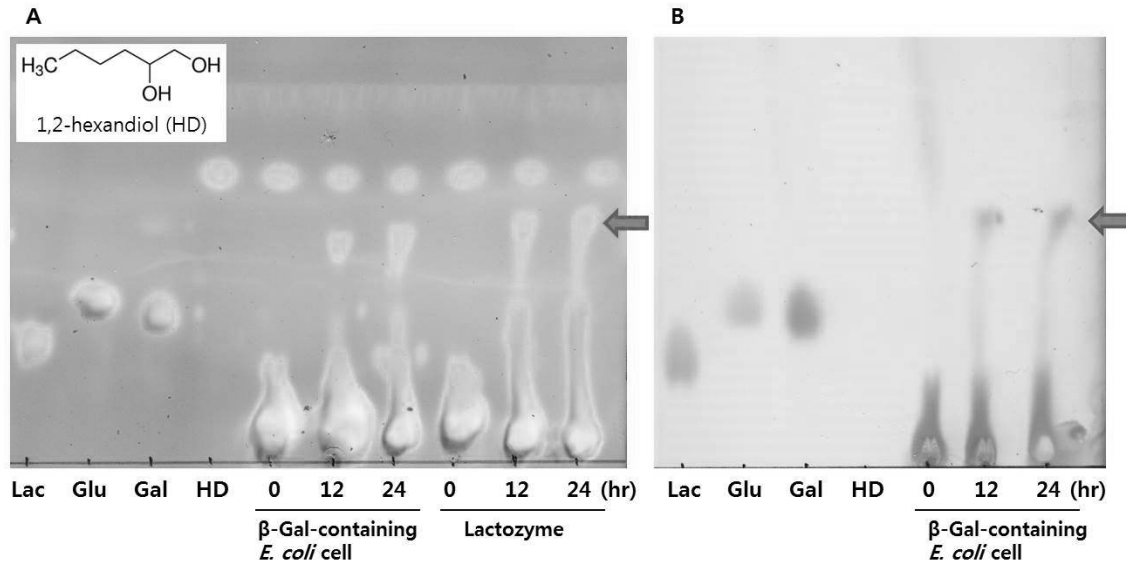


Fig. 1. TLC analyses for detecting HD-G spot. For the transgalactosylation reaction, (A)  $\beta$ -gal-containing *E. coli* cells and Lactozyme were used (the staining solution; #1) and (B)  $\beta$ -gal-containing *E. coli* cells were used (the staining solution; #2). Molecular structure of HD was shown in the upper left of panel A. Arrow indicates HD-G spots. Lac, Glu, Gal, and HD indicate 1% standards of lactose, glucose, galactose, and 1, 2-hexanediol, respectively.

를 조사하여 보았다(Fig. 2). 이때, *E. coli*  $\beta$ -gal을 이용한 transgalactosylation 반응의 조건은 Fig. 1에서 같았으며, HD의 농도만을 20에서 120 mM 까지 증가시켰다. 그 결과 HD 증가에 따라서 HD-G로 추정되는 spot도 동시에 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

합성된 HD-G의 mass를 분석하기 위하여, *E. coli*  $\beta$ -gal을 이용한 transgalactosylation 반응으로 얻은 반응물에서 HD-G로 추정되는 물질을 silica gel chromatography로 정제하고, 이를 농축하였다. 이 정제/농축된 물질을 TLC로 확인 한 후 (Fig. 3A), mass spectrometry 분석을 실시하여 그 mass를 구하였다(Fig. 3B). 분석 결과 303.1423(*m/z*)의 mass peak가 확인되었으며, 이는 HD-G의 sodium adduction ion ( $[M+Na]^+$ ) 형태

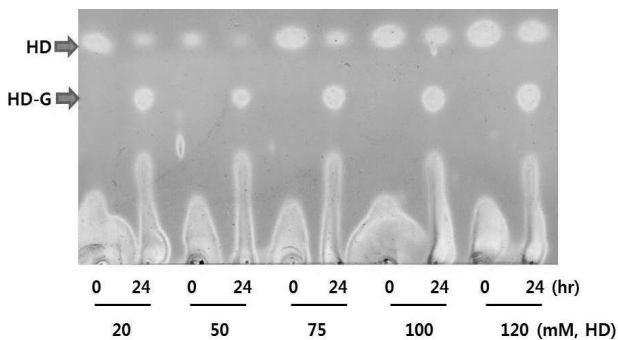


Fig. 2. Effect of HD concentration on HD-G synthesis during 24 hr (HD concentration; 20 to 120 mM). HD-G and HD spots in TLC were indicated by arrows. TLC plate was stained using staining solution #1.

로, 다음 괄호 안의 mass 계산식으로 확인할 수 있었다 [ $118.174(\text{HD})+180.156(\text{galactose})-18.015(\text{water})+22.989(\text{sodium})=303.301$ ]. 이 때, 추정되는 HD-G의 분자 구조식을 Fig. 3B에 표시하였다.

Galactose 한 분자가 HD와 결합 했다는 또 다른 증거를 제시하기 위하여, 정제한 HD-G를 상업적으로 파는 *E. coli*  $\beta$ -gal을 이용하여 48 시간 동안 가수분해 시켜보았다. 그리고 그 가수분해물을 TLC로 분석 하였다(Fig. 4). TLC로 분석한 결과 단당류가 가수분해로 분리되는 것을 확인 하였으며, 보다 정확한 판단을 위하여, TLC 이미지를 스캔하여 다시 분석 하였다. 그 결과 Fig. 4B와 같이 정제된 HD-G에서 분리된 단당류가 galactose (line #2 in Fig. 4B)임을 확인할 수 있었다. Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 종합하여 보면, 재조합 *E. coli*  $\beta$ -gal을 이용한 HD의 transgalactosylation 반응물로 부터 정제된 HD-G 추정물이 HD에 galactose가 한 분자 결합된 HD의 galactoside (HD-G) 라고 확인되어진다.

현재 사용하고 있는 화장품용 방부제의 경우 피부에 대한 부작용 문제가 대두되고 있다. 그래서, 이러한 문제를 극복하기 위한 방법으로 본 연구팀에서는 방부제 분자에 galactose 한 분자를 결합 시켜서 방부제 분자의 독성을 감소시키려는 연구를 수행하여왔다[7, 11]. 이 선행 연구에서 CPN-G의 cell viability는 5.0 mM에서 52.6% 증가하였고, PE-G의 cell viability는 40 mM에서 27.8% 증가하였다. 그러나 galactose 결합으로 인하여 향균력에는 큰 변화가 없었다. 이러한 전략은 이미 의약품 유효성분 분자의 독성과 기능성 향상을 위하여 galactose를 결합시키는 방법으로 잘 알려져 있다. 의약품 분자에

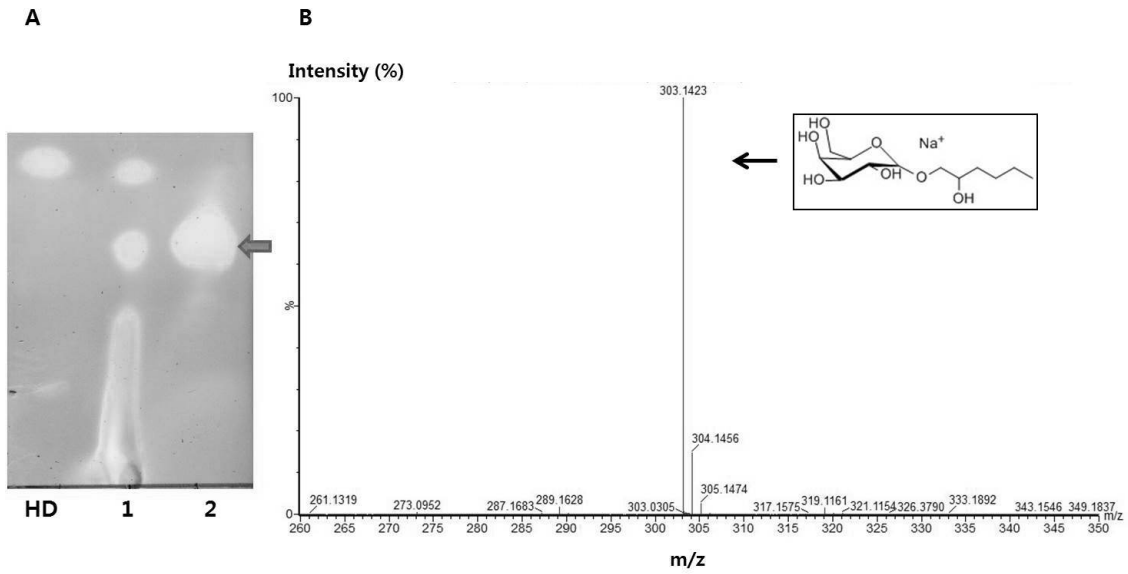


Fig. 3. TLC analysis of purified HD-G and its mass spectrum data. (A) TLC data of standard HD (1%), reaction mixture of transgalactosylation of HD (lane 1), and purified HD-G (lane 2). Arrow indicates HD-G spots. TLC plate was stained using staining solution #1. (B) Mass spectrum data of purified HD-G. The arrowed mass peak indicates the sodium adduct ions of HD-G ( $[M+Na]^+$ ). Its molecular structure is shown in the box of panel B.

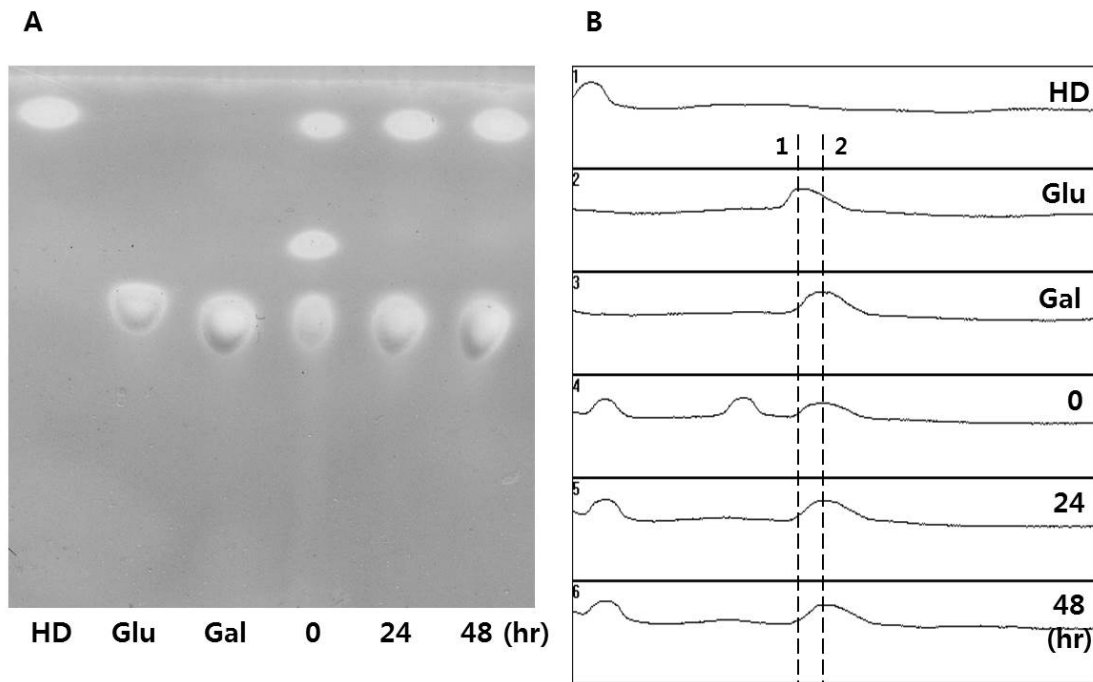


Fig. 4. Time-course profile of the hydrolysis of purified HD-G by *E. coli*  $\beta$ -gal. (A) TLC data and (B) scanned TLC profile. Dashed lines #1 and #2 indicate glucose and galactose, respectively. TLC plate was stained using staining solution #1. HD, Glu, and Gal indicate 1% standards of 1, 2-hexanediol, glucose, and galactose, respectively.

galactose를 결합시키면 독성이 감소하고, 물에 대한 용해도가 증가하고, 표적으로의 약물 전달능력이 향상된다는 연구보고는 많이 발표되었다[2, 4, 12, 16]. 본 연구에서도 이러한 근거를 바탕으로 HD에 재조합 *E. coli*  $\beta$ -gal를 이용한 transgalactosy-

lation을 실시하였으며, transgalactosylation 반응과 생성된 HD-G를 확인하는 것이 본 연구의 주요 목적이었다. 이미 언급한 결과와 같이 HD-G의 합성을 확인하고, HD-G에 대한 정보를 좀더 확인하기 위하여 학술정보와 chemical substance의

database인 SciFinder®를 이용하여 검색하여 보았다. 그 결과 HD-G과 관련된 어떠한 정보도 얻을 수 없었다. 현재로서는 합성된 HD-G가 신규한 분자로 결론을 내렸으며, HD-G에 대한 추가적인 정보를 수집하고 있는 중에 있다.

일반적으로  $\beta$ -gal에 의한 transgalactosylation 반응에서는 hydroxyl group (-OH)에 galactose 한 분자가 결합하는 것으로 알려져 있다. HD-G의 경우에도 두 개의 hydroxyl group 중에서 한 군데에 galactose가 결합한 것으로 추정된다. 본 연구 팀의 연구결과[7, 11]와 다른 선행연구 결과[1, 13]에 의하면 primary alcohol의 -OH에 galactose가 결합하는 것으로 알려져 있다. HD-G도 이와 마찬가지로 primary alcohol의 -OH에 결합했을 것으로 현재 추정하고 있다(Fig. 3B). 앞으로 NMR 분석을 통하여 galactose의 정확한 결합 위치를 조사할 예정이다. 또한, 본 연구팀의 선행 연구 결과에서와 같이 galactose 한 분자의 결합은 방부제의 항균력의 변화를 가지고 올 수 있다[7, 11]. 그래서 후속 연구를 통하여서 항균력의 변화를 조사할 예정이며, 피부세포에 대한 세포 독성의 변화를 조사할 예정으로 있다. 아마도 선행연구의 CPN galactoside [11]와 PE galactoside [7]의 경우와 같이 항균력은 유사하게 유지하면서, 피부세포에 대한 독성이 감소된 새로운 화장품용 방부제 확인을 기대하며, 추가 연구를 계속 수행할 예정이다.

## 감사의 글

2015년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였음.

## References

- Bridiau, N., Taboubi, S., Marzouki, N., Legoy, M. D. and Maugard, T. 2006.  $\beta$ -Galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnol. Prog.* **22**, 326-330.
- Davis, B. G. and Robinson, M. A. 2002. Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **5**, 279-288.
- Herman, A., Herman, A. P., Domagalska, B. W. and Mlynarczyk, A. 2013. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian J. Microbiol.* **53**, 232-237.
- Huang, J., Gao, F., Tang, X., Yu, J., Wang, D., Liu, S. and Li, Y. 2010. Liver-targeting doxorubicin-conjugated polymeric prodrug with pH-triggered drug release profile. *Polym. Int.* **59**, 1390-1396.
- Johnson, W. Jr., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D., Marks, J. G. Jr., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W. and Andersen, F. A. 2012. Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* **31**(5 Suppl), 147S-168S.
- Jung, K. H. 2008. Enhanced enzyme activities of inclusion bodies of recombinant  $\beta$ -galactosidase via the addition of inducer analog after L-arabinose induction in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 434-442.
- Jung, K. H. and Lee, H. Y. 2015. *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 365-372.
- Jung, K. H., Yeon, J. H., Moon, S. K. and Choi, J. H. 2008. Methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside enhances the enzymatic activity of recombinant  $\beta$ -galactosidase inclusion bodies in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 695-701.
- Lee, E., An, S., Cho, S. A., Yun, Y., Han, J., Hwang, Y. K., Kim, H. K. and Lee, T. R. 2011. The influence of alkane chain length on the skin irritation potential of 1,2-alkanediols. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**, 421-425.
- Lee, J. Y., Lee J. N., Lee, G. T. and Lee, K. K. 2012. Development of antimicrobial plant extracts and its application to cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **38**, 171-179.
- Lee, S. E., Jo, T. M., Lee, H. Y., Lee, J. and Jung, K. H. 2013.  $\beta$ -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1299-1312.
- Melisi, D., Curcio, A., Luongo, E., Morelli, E. and Rimoli, M. G. 2011. D-Galactose as a vector for prodrug design. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2288-2298.
- Scheckermann, C., Wagner, F. and Fischer, L. 1997. Galactosylation of antibiotics using the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 629-634.
- Sanchez-Prado, L., Alvarez-Rivera, G., Lamas, J. P., Llompard, M., Loresa, M. and Garcia-Jares, C. 2013. Content of suspected allergens and preservatives in marketed baby and child care products. *Anal. Methods* **5**, 416-427.
- Siti-Zulaikha, R., Sharifah-Norkhadajah, S. I. and Praveena, S. M. 2015. Hazardous ingredients in cosmetics and personal care products and health concern: A review. *Public Health Res.* **5**, 7-15.
- Tietze, L. F. and Schmuck, K. 2011. Prodrugs for targeted tumor therapies: recent developments in ADEPT, GDEPT and PMT. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 3527-3547.

**초록 :  $\beta$ -galactosidase 함유하는 재조합 대장균 세포를 이용한 1,2-hexanediol galactoside의 합성**

김이옥 · 정경환\*

(한국교통대학교 생명공학과)

최근 화장품에 쓰이는 방부제에 대한 피부 부작용이 보고되고 있다. 그 중에서 1,2-hexanediol (HD)는 방부기능과 보습기능을 가지고 있는 물질로 알려져 있는데, 본 연구에서는 보다 안전한 화장품용 소재를 개발하기 위하여  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal)을 함유하고 있는 대장균 세포를 이용한 transgalactosylation 반응을 통하여 1,2-hexanediol galactoside (HD-G)을 합성하는 연구를 수행하였다. 이 반응은 높은 농도의 lactose (300 g/l) 조건에서 24시간 동안 수행되었으며, 반응 시간이 12시간 지난 후부터 새로운 spot이 TLC 분석으로 확인되었다. 이 spot을 잠정적으로 HD-G로 추정된 후, 이 물질을 silica gel chromatography로 정제한 후, mass spectrometry 분석을 통하여, 이 물질이 HD-G의 sodium adduct ion ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z=303.1423$ )임을 확인하였다. 추가적으로 정제된 HD-G를 시판되는  $\beta$ -gal을 이용하여 가수분해하고, 유리된 단당류를 TLC로 분석하여 보았다. 이 때, galactose 한 분자가 HD-G로부터 유리 되는 것을 확인하였다. 결론적으로, 재조합 대장균  $\beta$ -gal을 이용하여 HD로부터 HD-G이 합성되었음을 확인할 수 있었으며, 앞으로 추가연구를 통하여 항균력의 변화와 피부세포에 대한 세포독성 변화를 조사할 예정이며, 기능성에 변화가 없는 보다 안전한 화장품용 방부제가 개발되기를 기대하고 있다.