

Solvent Extraction과 Gel Chromatography를 이용한 Phenoxyethanol Galactoside와 Chlorphenesin Galactoside의 정제

정경환[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2017년 11월 14일 접수: 2017년 11월 21일 수정: 2017년 12월 7일 채택)

Purifications of Phenoxyethanol Galactoside and Chlorphenesin Galactoside using Solvent Extraction followed by Gel Chromatography

Kyung-Hwan Jung[†]

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

(Received November 14, 2017; Revised November 21, 2017; Accepted December 7, 2017)

요약 : 재조합 β -galactosidase (β -gal) 을 이용하여 transgalactosylation 반응으로 합성된 2-phenoxyethanol galactoside (PE-gal)과 chlorphenesin galactoside (CPN-gal)의 정제를 실시하였다. 먼저 PE와 PE-gal이 포함된 반응물에 ethyl acetate (EA)를 넣고, EA/water 이상계 시스템에서 PE와 PE-gal을 분획하였다. 이 시스템에서 PE는 EA층으로 PE-gal은 water층으로 분획되었다. 그리고, 물층을 모아서 silica gel chromatography를 실시하였다. 최종적으로, silica gel chromatography만 실시하여 PE-gal을 정제한 경우와, EA 처리 후 silica gel chromatography를 실시하여 PE-gal을 정제한 경우의 정제 PE-gal에 대하여 HPLC (High performance liquid chromatography)와 TLC (thin-layer chromatography) 분석을 수행하였다. 그 결과 EA를 처리하여 분획한 후, silica gel chromatography를 수행한 시료에서 잔여 PE가 완전히 제거되는 것을 관찰하였고, silica gel chromatography만 실시하여 PE-gal을 정제한 경우에는 상당량의 잔여 PE가 관찰되었다. 이 때, mole 기준으로 약 21%의 정제 수율을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 CPN-gal의 정제에서도 EA 분획 처리 후, silica gel chromatography를 수행하였더니, 잔여 CPN이 거의 없는 순수한 CPN-gal을 얻을 수 있었다.

주제어 : 2-페녹시에탄올 갈락토사이드, 클로르페네신 갈락토사이드, 베타-갈락토시데이즈, 에틸아세테이트 추출, 실리카겔 크로마토그래피

Abstract : We investigated the purifications of PE-gal and CPN-gal, synthesized by transgalactosylation reaction using recombinant β -gal. The reaction mixture containing PE and PE-gal was first mixed with EA, and thereafter PE and PE-gal were distributed in two-phase

[†]Corresponding author
(E-mail: khjung@cjnu.ac.kr)

(EA/water) system. In this system, PE and PE-gal was selectively moved into EA and water phase, respectively. Then, the water phase was collected, and silica gel chromatography was carried out using the collected water phase. Finally, we compared two purified PE-gal samples using HPLC and TLC analysis, in which the one was purified only by silica gel chromatography and the other was purified by EA extraction followed by silica gel chromatography. In the latter case, the residual PE was almost completely removed, whereas, in the former case, the residual PE was remained remarkably. Additionally, the purification yield of PE-gal was about 21% on the basis of mole. In the same purification protocol, CPN-gal was able to be purified using EA extraction followed by silica gel chromatography, in which the residual CPN was almost removed when CPN-gal was purified by EA extraction followed by silica gel chromatography.

Keywords : 2-Phenoxyethanol galactoside, Chlorphenesin galactoside, β -Galactosidase, Ethyl acetate extraction, Silica gel chromatography

1. 서론

화장품에 사용하는 방부제(살균/보존제)로 인한 부작용으로 많은 피부질환 문제를 일으키고 있으며[1, 2, 3], 이러한 문제 해결을 위하여 여러 가지의 대안이 제시되고 있다[4, 5]. 그 중에서도 기존에 사용하고 있는 방부제 물질의 부작용을 감소시킬 수 있는 방법으로 방부제의 galactoside 유도체를 개발하여 적용하려는 방안이 제시되어 왔다[6-9]. 본 연구 팀에서 연구한 chlorphenesin (CPN), 2-phenoxyethanol (PE), 1, 2-hexanediol (HD)과 같은 방부제 들의 항균력은 미생물의 세포막 기능의 저해로부터 기인한다고 보고되고 있다[3,10,11,12]. CPN, PE 그리고 HD의 경우에 분자 내에 친수성 부분과 소수성 부분이 존재하고 이로 인하여 세포막의 기능을 저해하고, 결국에는 세포의 성장을 억제한다고 알려져 있다. 마찬가지로 사람 피부세포의 세포막에도 이러한 방부제가 유사하게 작용하여 사람 피부에 부작용을 유발시킬 수 있다고 추론할 수 있다. 그래서 방부제 galactoside 유도체의 galactose 한 분자가 원래의 친수성/소수성 균형에 변화를 초래하여, 부작용 유발을 감소시켰을 것으로 생각하고 있다. 이 때, 항균력의 변화도 관찰될 수 있기 때문에 이에 대한 추가 연구가 진행 중에 있다.

이러한 목적으로 그 동안 β -galactosidase (β -gal)을 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 고농도의 lactose 존재조건에서 transgalactosylation 반응으로 CPN, PE, HD의 유도체인 CPN

galactoside (CPN-gal) (Fig. 1) [6, 7], PE galactoside (PE-gal) (Fig. 1) [8, 9], 그리고 HD galactoside (HD-gal) [13, 14]가 합성되었다. 또한, 합성된 CPN-gal과 PE-gal의 경우에는 galactoside 유도체가 피부세포에 대한 독성을 현저히 감소시키는 결과를 보여주었다[7, 9]. 그래서 이러한 galactoside 유도체의 화장품 적용에 대한 관심이 높아지고 있다.

본 연구 팀에는 이미 선행연구를 통하여 물과 ethyl acetate (EA)에 이상계(two-phase system)에서 합성된 PE-gal이 물층에 대한 분배계수가 galactose의 결합으로 PE 보다 매우 크다는 결과를 얻었다[9]. 그래서 이러한 이상계를 transgalactosylation 반응 후, PE와 PE-gal을 분리하는데 적용할 수 있을 것으로 이미 제안하였다. 그리고, 또 하나의 선행연구를 통하여 이 원리를 HD-gal의 정제에도 응용하여 반응물을 물과 EA의 이상계에 혼합한 후, 물층으로는 HD-gal을 분획하고, EA층으로는 반응 후 잔여물인 HD를 분획하는 방법으로 HD-gal 정제에 이용하였다[14]. 그래서, 본 연구에서는 이러한 이상계를 실제로 PE-gal과 CPN-gal의 정제에 응용하려고 한다.

본 연구의 목적은 그 동안 β -gal 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 transgalactosylation 반응으로 합성한 다른 두 가지의 galactoside인 PE-gal과 CPN-gal의 정제에도 이러한 물과 EA의 이상계를 적용할 수 있는지 확인/검증하는데 있다. 이를 통하여 galactose 유도체를 정제할 때, EA와 같은 water-immiscible 용매를 일반적으로

확장 사용할 가능성이 있는지를 알아보려고 한다.

2. 실험

2.1. 시약

2-Phenoxyethanol과 chlorphenesin 은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, thin-layer chromatography (TLC) plate 는 Macherey-Nagel (Düren, Germany)의 DC-Fertigplatten SIL G-25 UV₂₅₄를 사용하였다. PE-gal과 CPN-gal 정제를 위한 silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μm)을 사용하였고, 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β-Gal을 생산하는 재조합 대장균

대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/*Myc-His/lacZ* vector (7.2 kb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 *E. coil* MC1061를 발현 숙주로 하여 β-gal을 발현하였다. β-gal 유전자는 pBAD/*Myc-His* expression kit 의 유전자를 사용하였다. 재조합 *E. coil* 제작과 재조합 β-gal을 함유한 *E. coil*의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[6-9].

2.3. β-Gal 함유 대장균을 이용한 PE-gal과 CPN-gal 합성

PE-gal 합성의 경우에는 15 ml conical tube 에 300 g/l lactose, 0.96 U/ml β-gal 함유 대장균, 1% PE를 50 mM phosphate buffer (pH 8.0)로 녹여서, 전체 부피를 10 ml 되게 한 후 수행하였다(Fig. 1). 그리고 shaking incubator (40°C, 100 rpm) 에서 48 시간 동안 합성 반응 시켰다. 그리고, 더 많은 양의 PE-gal 합성을 위하여는 전체 반응 부피를 40 ml까지 증가시켜 50 ml conical tube에서 반응을 수행하였고, 반응에 필요한 lactose, β-gal 함유 대장균, 1% PE의 양도 같은 비율로 증가시켰다.

CPN-gal의 합성은 50 mM phosphate buffer (pH7.0)에 400 g/l lactose, 4.8 U/ml β-gal 넣고, 40 mM CPN를 녹인 후, 40 ml로 부피를 맞추고 50 ml conical tube에서 반응을 수행하였다 (Fig. 1). 자세한 반응 조건은 선행연구에 상세히

기록되어 있다[6, 7].

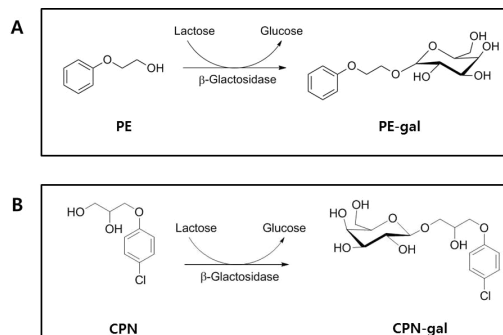


Fig. 1. Enzymatic galactosylation of (A) PE and (B) CPN using *E. coli* β-gal.

2.4. Silica gel chromatography를 이용한 PE-gal 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, PE-gal 혹은 CPN-gal이 함유된 반응액 이나 용매 추출물 8 ml를 loading 한다. 그 후 이동상을 중력에 의하여 연속적으로 흘리면서 80 ml씩 분획물을 받고, 그 분획물을 TLC로 분석하였다. 그리고, 필요에 따라서 rotary vacuum evaporator로 분획물의 물을 증발 시켜 농축하였다.

2.5. Extraction of the reaction mixture using ethyl acetate

10 ml 반응액의 경우에는 500 μl 반응액과 500 μl 용매(EA)를 1 : 1 (v/v)로 넣고 vortexing 한 후, 층 분리가 일어날 때까지 실온에 방치한다. 층 분리가 일어나면 용매 층을 제거한다. 그리고, 나머지 물 층에 다시 500 μl 용매를 넣고, vortexing 하고, 층 분리를 시키고, 용매 층을 제거한다. 용매 층에는 PE이, 물 층에는 PE-gal이 더 잘 녹는 성질을 이용하여 PE과 PE-gal을 분획하였다[9]. 이 때, 이러한 분획 방법을 총 3회의 실시하여 물층을 모아 PE-gal을 분획하였다. 만약 40 ml 반응액을 처리 할 경우에는 9 ml 씩 4개로 나누고, 위의 방법과 같이 각각을 9 ml의 용매로 3회 분획하여 물층만 모

아서 PE-gal 혹은 CPN-gal을 분획하였다. 그리고, 필요에 따라서 rotary vacuum evaporator로 분획물의 물을 증발 시켜 농축하였다.

2.6. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 시료를 loading하고 acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v) 혹은 EA : MeOH : water = 17 : 2 : 1 (v/v)을 이동상으로 하여 15 분 전개하였다. EA : MeOH : water = 17 : 2 : 1 (v/v)을 이동상으로 사용할 경우에는 3회 전개하였다. 그리고 staining solution #1 (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 ml 10 % NaOH in 200 ml water) 혹은 staining solution #2 (5 g phosphomolybdic acid hydrate, 2 g cerium(IV) sulfate tetrahydrate, 12 ml sulfuric acid in 200 ml water) 를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 분간 말려서 밴드를 확인 하였다. TLC 분석에 사용한 시료 부피는 기본적으로 1.0 μl 이며, silica gel chromatography를 이용한 정제 후, 분획물을 분석할 때는 20 μl의 시료를 사용하였다.

2.7. HPLC 분석

High performance liquid chromatography (HPLC) (YL 9100 system, Younglin, Seoul, Korea)를 PE와 PE-gal의 분석에 사용하였다. C₁₈ column (Hypersil GOLD, 150 × 4.6 mm, particle size 5 μm, Thermo Scientific, USA)을 사용하여 분석하였고, 280 nm에서 UV/Vis detector로 검출하였다. 시료 부피는 20 μl, 이동상으로 30% acetonitrile을 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 ml/min 이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Silica gel chromatography를 이용한

PE-gal 정제

β-Gal 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 transgalactosylation 반응으로 PE-gal 합성반응을 실시한 후, PE-gal을 정제 하기 위하여 silica gel chromatography를 수행하였다(Fig. 2). 이 때, 반응액 8 ml를 column에 loading 하여 정제하였는

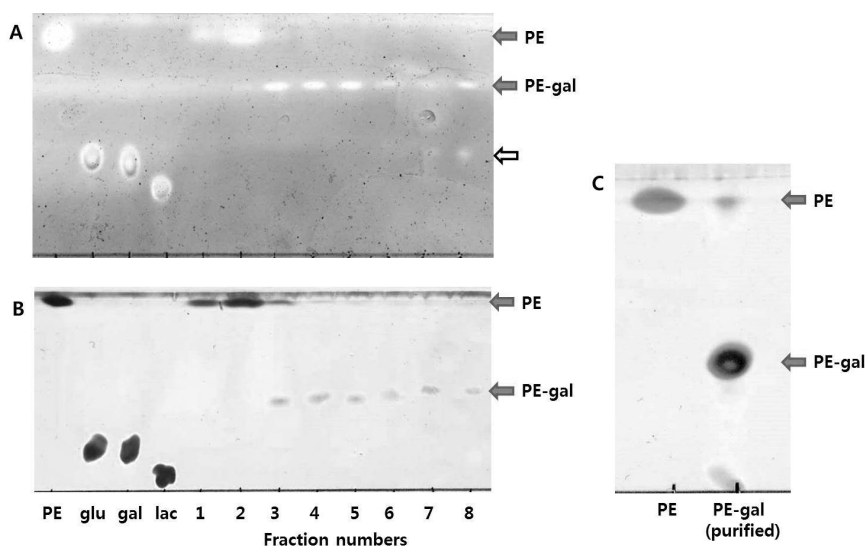


Fig. 2. TLC analyses of (A)(B) the fractions from silica gel chromatography and (C) purified PE-gal. Mobile phase composition was (A) acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v) and (B) EA : methanol : water = 17 : 2 : 1 (v/v). TLC plates were stained using (A) staining solution #1 and (B) #2. PE, glu, gal, and lac represent 1% standards of 2-phenoxyethanol, glucose, galactose, and lactose, respectively. Open arrow indicates monosaccharide.

데, 이 방법은 선행연구에서 PE-gal [6, 7] 혹은 CPN-gal [8, 9]의 정제를 위하여 일반적으로 사용하였던 방법이였다. Fig. 2A와 Fig. 2B에서 관찰되듯이 fraction 전반부에는 PE가 용출되었고, 후반부에는 단당류 등이 용출되었다. 이와 같은 결과는 HD-gal의 정제를 수행한 선행연구에서도 같은 현상이 관찰되었다[14]. Fig. 2A와 Fig. 2B의 TLC 결과를 바탕으로 잔여 PE가 최소로 혼입되고, 잔여 단당류가 최소로 혼입된 4, 5, 6번 fraction을 모아서, 농축하여 PE-gal의 정제를 완성하였다. 그러나, Fig. 2C의 결과에서와 같이 이러한 정제 후에 잔여 PE가 완전히 제거되지 않고 혼입되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 즉, 반응물에서 PE-gal을 정제하기 위하여 silica gel chromatography를 실시할 경우에 잔여 PE가 완전히 제거되지 않으며, 순도 높은 PE-gal 정제를 위하여서는 PE의 효율적인 제거가 필요하다는 결론을 얻게 되었다.

3.2. PE-gal 정제에 Ethyl acetate 분획 이용

Fig. 2의 결과에서 반응물에서 잔여 PE의 제거가 필요하다는 결론을 얻었기 때문에, 선행연구 결과를 바탕으로 silica gel chromatography 수행

전에 EA를 반응액에 혼합한 이상계 시스템에서 EA층과 물층으로 PE와 PE-gal의 분획을 실시하여 보기로 하였다[9]. 그래서 Fig. 3에서와 같이 반응액 9 ml를 EA와 물이 있는 이상계에서 분획 처리하였다. 이 때, 물층만 계속 모으면서 연속적으로 3회 EA를 넣고 분획 처리하였다. 그 결과 물층으로는 PE-gal가 모이고, EA층으로는 PE가 모이는 현상을 관찰하였고, 물층에서는 더 이상 PE가 관찰되지 않았고, 물층에는 PE-gal만 TLC 상에서 관찰되었다. PE는 첫 번째 EA를 처리할 때, 대부분 EA층으로 분획 제거되는 것으로 확인 되었다.

3.3. Ethyl acetate 분획과 Silica gel chromatography를 이용한 PE-gal 정제

Fig. 2와 Fig. 3의 결과를 바탕으로 40 ml 반응물에서 PE-gal의 정제를 실시하였다. 먼저 반응물을 EA로 분획 처리하여 잔여 PE를 제거한 다음에 silica gel chromatography를 수행하여 순수한 PE-gal을 정제하였다. 이 때, 비교를 위하여 Fig. 2에서와 같이 EA 분획 처리를 하지 않고 PE-gal을 정제 한 경우의 최종 정제 시료도 준비 하였다. 이 두 가지의 최종 정제 시료를 HPLC로

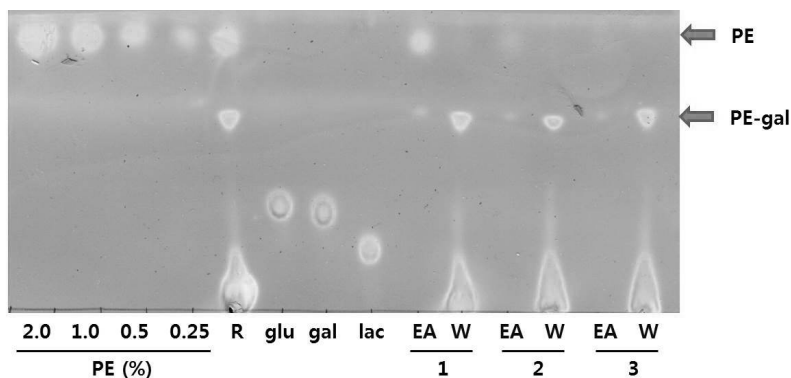


Fig. 3. TLC analysis after the extraction of reaction mixture using EA. EA and W indicates ethyl acetate and water phase, respectively, after the extraction of reaction mixture. Number 1, 2, and 3 represent the first, second, third extraction, respectively, using EA. Mobile phase composition was acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v). TLC plate was stained using staining solution #1. PE represents 0.25 to 2.0% standards of 2-phenoxyethanol. R, glu, gal, and lac indicate the reaction mixture, 1% standards of glucose, galactose, and lactose, respectively.

분석하여 보았는데, 그 결과 Fig. 4A와 Fig. 4B 같이 EA를 처리한 경우에 정제된 PE-gal 시료에서는 매우 작은 잔여 PE가 확인되었고(PE-gal 순도 99.3%), EA 처리를 하지 않은 경우에는 상대적으로 보다 많은 양의 잔여 PE (PE-gal 순도 85.1%)가 관찰 되었다. 이 두 가지 시료를 TLC로 분석한 결과에서도 EA로 반응물을 분획 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 잔여 PE 혼입 양상을 확실히 관찰할 수 있었다(Fig. 4C). 이때, 분석에 사용한 두 가지 시료는 silica gel chromatography fraction을 모아서 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 얻었으며, 그 양은 150 μ l 정도였고, 1,000배 희석하여 HPLC와 TLC 분석에 사용하였다.

PE-gal 정제의 정량적 분석을 위하여, EA로 분획 처리하여, 잔여 PE를 제거하고, silica gel chromatography로 정제한 경우의 정제 수율을 계산하여 보기로 하였다. 40ml 총 반응액에서 9 ml 씩 4번에 나누어서 EA를 처리하고, 물층으로 PE-gal을 모았다. 이 때, 8 ml 물층을 4회 얻을 수 있었고, 이를 각각 4개의 silica gel chromatography column에 loading 하여 정제를

수행하였다. 그 결과 얻어진 chromatography의 fraction의 부피는 1,600 ml 였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 150 μ l의 최종 정제 PE-gal을 얻었다. 이 결과를 아래와 같이 mole 기준으로 수율을 분석하여보았다. 반응에 첨가한 PE의 mole (1% PE가 포함된 36 ml 반응액에서 부터 정제 시작, PE 분자량 =138.16) 양은 아래 식과 같이 계산 가능하고,

$$\frac{10 \left(\frac{g}{l}\right)}{138.16 \left(\frac{g}{mole}\right)} \times 0.036 (l) = 2.6 \times 10^{-3} (mole) \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

최종 정제된 PE-gal의 mole (150 μ l의 PE-gal 정제액, PE-gal의 비중 1.1로 가정) 양은 아래 식과 같이 계산 가능하였다.

$$\frac{0.165 (g)}{300.16 \left(\frac{g}{mole}\right)} = 5.5 \times 10^{-4} (mole) \dots \dots \dots \textcircled{2}$$

그래서, PE-gal의 정제 수율(①/②)은 약 21% 정도로 계산되었다. 물론 PE-gal의 비중을 1.1로 가정한 결과 이지만, 이전의 연구 결과에서 HD-gal의 정제 수율 8.9% (mole 기준) 보다는 매우 높은 결과로 생각된다[14].

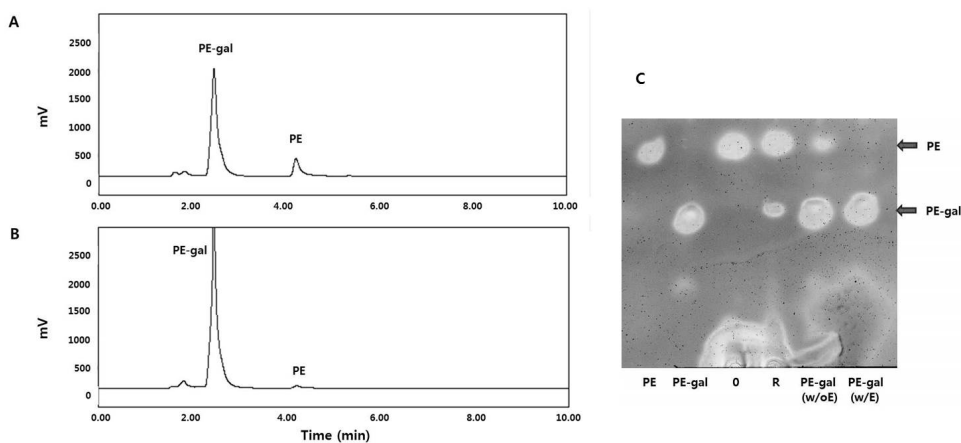


Fig. 4. Comparison of purified PE-gal without and with EA extraction. HPLC chromatograms of purified PE-gal (A) without and (B) with EA extraction. Peaks of PE-gal and PE were shown at 2.45 and 4.21 min, respectively. (C) TLC analysis of purified PE-gal, PE and PE-gal indicate 1% standards of 2-phenoxyethanol and 2-phenoxyethanol galactoside, respectively. 0 and R indicate the sample at zero time and reaction mixture, respectively, from transgalactosylation of PE, respectively. PE-gal(w/oE) and PE-gal(w/E) indicate purified PE-gal without EA extraction and purified PE-gal with EA extraction, respectively. Mobile phase and staining solution were the same as those in Fig. 3.

3.4. Ethyl acetate 분획 및 Silica gel chromatography의 CPN-gal 정제에 적용

PE-gal 정제에서와 같이 선행연구에서는 CPN-gal을 정제 시, EA 분획 처리를 하지 않고 silica gel chromatography 만 실시하여 CPN-gal을 정제하였다[6, 7]. 그러나, 많은 fraction에서 CPN이 혼입되어 있어서, 순수 정제를 위하여 취할 수 있는 fraction 수가 제한적이 이었다. 그래서, 위에서 수행한 PE-gal의 정제 방법과 같은 방법으로 CPN-gal의 정제를 실시하여 보았다. Fig. 5와 같이 TLC로 EA로 분획 처리한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교 분석하였더니, 먼저 반응액을 EA 분획 처리하고, silica gel chromatography를 실시한 경우에 완전히 잔여 CPN가 제거되는 것으로 관찰되었다. 그러나, EA 분획 처리를 하지 않은 경우에는 잔여 CPN가 다량 관찰되었다. 이 때도 정제한 CPN-gal도 최종

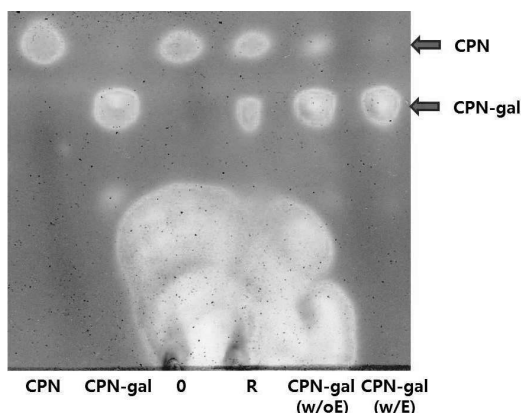


Fig. 5. TLC analysis of purified CPN-gal. CPN and CPN-gal indicate 1% standards of chlorphenesin and chlorphenesin galactoside, respectively. 0 and R indicate the sample at zero time and reaction mixture, respectively, from transgalactosylation of CPN, respectively. CPN-gal(w/oE) and CPN-gal(w/E) indicate purified CPN-gal without EA extraction and purified CPN-gal with EA extraction, respectively. Mobile phase and staining solution were the same as those in Fig. 3.

적으로 rotary vacuum evaporator에서 농축을 통하여 약 150 μ l 정도의 양을 확보할 수 있었다. TLC 분석도 최종 CPN-gal 정제 용액을 1,000배 희석하여 사용하였다.

4. 결론

β -Gal 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 transgalactosylation 반응으로 PE-gal과 CPN-gal의 합성반응을 실시한 후, PE-gal과 CPN-gal의 정제를 실시하였다. PE-gal 정제의 경우 먼저 반응물을 EA로 분획 처리하여 잔여 PE를 제거한 다음 silica gel chromatography를 수행하여 순수한 PE-gal을 정제할 수 있었다. 이 때, EA를 처리하여 분획한 경우와 그렇지 않은 경우의 두 가지 최종 정제 시료를 HPLC와 TLC로 분석하였고, EA를 처리하여 분획한 시료에서 잔여 PE가 완전히 제거되는 것을 확인하였다. 그리고, 이렇게 반응물에서 EA 분획처리와 silica gel chromatography를 이용하여 PE-gal을 정제할 경우에 mole 기준으로 약 21%의 정제 수율을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 CPN-gal의 경우도 같은 방법으로 반응물에서 잔여 CPN을 제거하기 위하여 EA 분획 처리 후, silica gel chromatography를 수행하였더니, 순수한 CPN-gal을 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2017년 한국교통대학교 지원을 받아 수행하였습니다. 본 연구를 위하여 도움을 준 한국교통대학교 생명공학과 김진희 학생에게 감사의 말을 전합니다.

References

1. V. Jadhav, S. Dhande, V. Kadam, "Cosmetics Side Effects", *World Journal of Phamarcy and Pharmaceutical Sciences*, Vol.6, No.1 pp. 327-343, (2017).
2. G. Deza, A. M. Giménez-Arnau, "Allergic Contact Dermatitis in Preservatives: Current Standing and Future Options",

- Current Opinion in Allergy Clinical Immunology*, Vol.17 No.4 pp. 263-268, (2017).
3. E. Lee, S. An, D. Choi, S. Moon, I. Chang, "Comparison of Objective and Sensory Skin Irritations of Several Cosmetic Preservatives", *Contact Dermatitis*, Vol.56 No.3 pp. 131-136, (2007).
 4. B. Fang, M. Yu, W. Zhang, F. Wang, "A New Alternative to Cosmetics Preservation and the Effect of the Particle Size of the Emulsion Droplets on Preservation Efficacy", *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.38 No.5 pp. 496-503, (2016).
 5. A. Kerdudo, P. Burger, F. Merck, A. Dingas, Y. Rolland, T. Michel, X. Fernandez, "Development of a Natural Ingredient-natural Preservative: a Case Study", *Comptes Rendus Chimie*, Vol.19 No.9 pp. 1077-1089, (2016).
 6. S. -E. Lee, H. -Y. Lee, K. -H. Jung, "Production of Chlorphenesin Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-containing *Escherichia coli*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.23 No.6, pp. 826-832, (2013).
 7. S. -E. Lee, T. M. Jo, H. -Y. Lee, J. Lee, K. -H. Jung, " β -Galactosidase-catalyzed Synthesis of Galactosyl Chlorphenesin and its Characterization", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol.171 No.6, pp. 1299-1312, (2013).
 8. H. -Y. Lee, K. -H. Jung, "Enzymatic Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-containing *Escherichia coli*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.24 No.9, pp. 1254-1259, (2014).
 9. K. -H. Jung, H. -Y. Lee, "Escherichia coli β -Galactosidase-catalyzed Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside and its Characterization", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol.38 No.2, pp. 365-372, (2015).
 10. K. A. Fitzgerald, A. Davies, A. D. Russell, "Mechanism of Action of Chlorhexidine Diacetate and Phenoxyethanol Singly and in Combination against Gram-negative Bacteria", *Microbios.*, Vol.70 No.284-285, 215-230, (1992).
 11. S. Langsrud, K. Steinhauer, S. L uthje, K. Weber, P. Goroncy-Bermes, A. L. Holck, "Ethylhexylglycerin Impairs Membrane Integrity and Enhances the Lethal Effect of Phenoxyethanol", *PLoS ONE*, Vol.11 No.10, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165228> (2016).
 12. E. B. Herman, G. J. Haas, W. H. Crosby, C. J. Cante, "Antimicrobial Action of Short Chain Alcohols and Glycols", *Journal of Food Safety*, Vol.2 No.3, pp. 131-139, (1980).
 13. Y. -O. Kim, K. -H. Jung, "Enzymatic Synthesis of 1, 2-Hexanediol Galactoside by Whole Cells of β -Galactosidase-containing Recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Life Science*, Vol.26 No.5, pp. 608-613, (2016).
 14. Y. -O. Kim, K. -H. Jung, " β -Galactosidase-catalyzed Synthesis of 1,2-Hexanediol Galactoside and its Purification Using Ethyl Acetate Extraction Followed by Silica Gel Chromatography", *Journal of the Korean Oil Chemists' Society*, Vol.33 No.3, pp. 498-506, (2016).