

베타-갈락토시데이즈를 이용하여 합성한 1, 2-Hexanediol Galactoside의 보습력과 항균력에 대한 연구

김 이 옥 · 정 경 환[†]

한국교통대학교 생명공학과

(2017년 11월 21일 접수, 2017년 12월 14일 수정, 2017년 12월 22일 채택)

Water-holding Capacity and Antimicrobial Activity and of 1, 2-Hexanediol Galactoside Synthesized by β -Galactosidase

Yi-Ok Kim and Kyung-Hwan Jung[†]

Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyung-gun, Chungbuk-do 27909, Korea
(Received November 21, 2017; Revised December 14, 2017; Accepted December 22, 2017)

요 약: 재조합 대장균의 β -galactosidase (β -gal)을 이용하여 transgalactosylation 반응으로 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal) 합성을 수행하였다. 먼저, 합성 반응을 수행할 때의, β -gal의 양, 1, 2-hexanediol (HD)의 양, 반응 pH, 반응 온도 등 반응조건을 최적화하였다. β -Gal은 4.8 U/mL, HD는 75 mM, pH는 7.0, 온도는 37 °C의 조건이 최적 합성 조건이었으며, 이때, 약 96%의 HD가 HD-gal로 conversion 되었다. 그리고, 돼지 epidermis를 이용하여 HD와 HD-gal의 water holding capacity (WHC)를 비교 측정하여 보았는데, 이때, epidermis 표면에 HD와 HD-gal을 84.4, 126.6, 168.8, 211.0 mM을 처리하였으며, 84.4, 126.6, 168.8 mM의 HD와 HD-gal을 처리하였을 경우 HD-gal이 HD보다 더 큰 WHC 값을 보여 주었고, 168.8 mM의 경우에는 HD-gal이 HD와 비교하여 최대 약 20% 정도의 더 큰 WHC 값을 보여 주었다. 그러나, HD-gal의 MIC (minimal inhibitory concentration) 값을 측정해 본 결과, *Enterococcus faecalis*의 경우에는 HD의 MIC와 같았으나, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*의 경우에는 약 3배에서 10배까지 HD-gal의 MIC 값이 HD에 비하여 증가되는 현상이 관찰되었다. 결론적으로, HD의 transgalactosylation 반응으로 인하여 합성된 HD-gal의 보습력은 HD에 비하여 증가되고, HD-gal의 항균력은 HD와 비교하여 감소하는 현상을 관찰하였다.

Abstract: We carried out the enzymatic synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal) by transgalactosylation reaction using recombinant *Escherichia coli* β -galactosidase (β -gal). The amounts of β -gal and 1, 2-hexanediol (HD), pH, and temperature, respectively, were first optimized (β -Gal, 4.8 U/mL; HD, 75 mM; pH, 7.0; temperature, 37 °C). Under these optimal conditions, about 96% HD was converted to HD-gal. When we investigated the water holding capacities (WHCs) of HD and HD-gal using pig epidermis in the concentrations of 84.4, 126.6, 168.8, 211.0 mM, WHC of HD-gal was superior to HD. In particular, at 168.8 mM HD and HD-gal, WHC of HD-gal showed about 20% greater than that of HD. However, it was observed that MIC values against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* of HD-gal were about three to ten times greater than those of HD, although MIC value of HD-gal against *Enterococcus faecalis* was almost the same as that of HD. Finally, it was concluded that the covalent bonding of a galactose molecule to HD (transgalactosylation) resulted in an increase in WHC of HD-gal and a decrease in anti-bacterial activity.

Keywords: 1, 2-hexanediol galactoside, β -galactosidase, transgalactosylation, water holding capacity, minimal inhibitory concentration

[†] 주 저자 (e-mail: khjung@cjnu.ac.kr)
call: 043)820-5246)

1. 서 론

최근까지 꾸준히 화장품용 방부제(살균/보존제)로부터 유발되는 피부질환의 문제가 보고되고 있다[1-5]. 이러한 문제를 완화 시키고 해결하기 위하여, 본 연구팀에서는 기존에 사용하고 있는 방부제의 부작용을 감소시키기 위한 방법으로 방부제의 galactoside 유도체에 대한 연구를 수행해 왔다[6-10]. 이를 위하여 β -galactosidase (β -gal)을 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 고농도의 lactose 조건에서 galactose 분자를 방부제 분자에 붙이는 transgalactosylation 반응으로 방부제 galactoside 유도체를 합성하였다. 이러한 전략은 이미 유용한 약물의 기능성 변화를 위한 방안으로 많은 연구가 이루어진 분야이다[11]. 본 연구팀은 그동안 chlorphenesin (CPN), 2-phenoxyethanol (PE), 1, 2-hexanediol (HD)의 galactoside 유도체인 chlorphenesin galactoside (CPN-gal) [6,7], 2-phenoxyethanol galactoside (PE-gal) [8,9], 그리고 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal) [10]의 합성에 대한 연구를 수행하였다. 흥미롭게도 합성된 CPN-gal과 PE-gal의 미생물에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC) 값은 CPN과 PE의 MIC 값과 거의 같았으나, 피부세포에 처리하여 세포독성을 조사하여 본 결과, CPN-gal과 PE-gal의 세포독성이 CPN과 PE에 비하여 현저하게 감소되는 결과를 확인할 수 있었다[7,9]. 이러한 피부세포 독성의 감소 효과가 앞에서 언급한 방부제에 의한 피부질환과 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 기대하고 있다. 일반적으로 방부제 분자의 구조는 친수성 부분과 소수성 부분이 존재하며, 이로 인하여 미생물의 세포막에 작용하여 세포막 기능에 영향을 주어서 세포의 사멸이나 성장 억제를 초래하는 것으로 알려져 있다[12-14]. CPN-gal과 PE-gal의 경우에는 galactose 결합이 이러한 작용 기전에 영향을 주지 않는 것으로 생각하고 있다.

본 연구에서는 HD의 transgalactosylation 반응 조건을 최적화 시키는 실험을 먼저 수행하였고, 합성된 HD-gal을 정제하여 transgalactosylation 반응으로 galactose 한 분자가 HD에 붙어서 HD-gal이 되었을 경우에 피부 보습력에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 조사를 이어서 실시하였다. 그리고, 추가적으로 MIC 값 측정을 통하여 HD-gal의 항균력 변화를 HD와 비교하면서 조사하여 보았다. 본 연구의 장기적인 목적은 피

부에 덜 해롭고 기능성이 뛰어난 화장품용 항균제 개발하는데 있으며, 아래 수행한 몇 가지 연구 결과와 앞으로 수행할 피부세포 독성실험 등의 수행으로 본 연구 목적이 달성될 것으로 기대하고 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 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 UV₂₅₄를 사용하였다. HD-gal 정제를 위한 silica gel은 Zeochem (Uetikon am See, Switzerland)의 ZEOprep 60 (60-200 μ m)을 사용하였고, nutrient broth, nutrient agar, potato dextrose broth 그리고 peptone, yeast extract 등 MIC 값 측정에 사용된 배지 성분은 Beckton Dickinson (New Jersey, USA)에서 구입하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β -Gal을 생산하는 재조합 대장균과 MIC 측정에 사용된 미생물

대장균의 *araBAD* 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/*Myc-His/lacZ* vector (7.2 kb) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 *E. coli* MC 1061를 발현 숙주로 하여 β -gal을 발현하였다. β -gal 유전자는 pBAD/*Myc-His* expression kit의 유전자를 사용하였고, 재조합 *E. coli* 제작과 재조합 β -gal을 함유한 *E. coli*의 배양방법 등에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기록하였다[15]. MIC 측정을 위하여 Gram-positive인 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 29212, Gram-negative인 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 29213가 사용되었다.

2.3. HD-gal합성과 정제

HD-gal 합성을 위하여 300 g/L의 lactose 용액에서 β -gal의 양, HD의 농도, pH, 그리고 온도 순으로 최적 조건을 조사하였다. 반응은 15 mL conical tube에서 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 조건에서 실시하였고, 전체 부피를 10 mL이며, shaking incubator에서 37°C, 100

rpm으로 48 h 동안 반응 시켰다. 최적조건을 확인한 후, HD-gal의 보습력과 MIC 값 측정을 위하여 최적조건에서 50 mL conical tube 안에서 합성반응을 수행하였으며, 전체 부피 40 mL였다. 그리고, 9 mL의 반응액과 9 mL ethyl acetate (EA)를 50 mL conical tube에 넣어 섞은 후, 물과 EA층으로 분획하여 EA층으로 잔여 HD를 제거하고, 물층으로 합성된 HD-gal을 분획하였다. 이러한 분획은 총 3회 실시하였고, 나머지 반응액도 이러한 분획을 계속 실시하여 잔여 HD가 제거되고, HD-gal이 모여 있는 물층 만을 모았다. 선행연구와 같은 조건으로 silica gel chromatography와 rotary vacuum evaporator를 이용하여 순수한 HD-gal을 정제/농축하였다. 자세한 조건은 선행연구에 상세히 기술하였다[16].

2.4. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 1.0 μL시료를 loading하고 acetonitrile : water = 85 : 15 (v/v)을 이동상으로 하여 15 min 전개하였다. 그리고 staining solution (1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 mL 10% NaOH in 200 mL water)를 TLC plate에 뿌린 후, 80°C oven에서 15 min간 말려서 밴드를 확인하였다. 정량 분석을 위하여 표준농도의 HD 시료를 시료와 같이 분석하였고, TLC plate를 이미지를 스캔한 후, AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leonardo, CA, USA)를 이용하여 band (혹은 spot)의 크기를 정량 분석하였다. HD의 transgalactosylation 반응에서 HD로부터 HD-gal로의 conversion (%)은 합성된 HD가 HD-gal로 모두 conversion 되었다고 가정하고, HD의 감소량을 기준으로 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Conversion (\%)} = (HD_0 - HD_t) / HD_0$$

(HD₀ = 반응 초기의 HD 양, HD_t = t 시간에 HD 양)

2.5. HD and HD-gal의 Water Holding Capacity

플라스틱 box (29.5 × 23 × 11.8 cm)에 물에 적신 cotton을 깔고, 아크릴판을 놓는다. 그리고, 도축한 지 12 h 이내의 pig epidermis를 1 × 2 cm로 잘라 올려놓고, HD와 HD-gal을 84.4, 126.6, 168.8, 211.0 mM의 농도로 각각의 pig epidermis 표면 위에 200 μL씩 loading하고 뚜껑을 닫는다. 그리고, 25°C incubator에서 1 h 동안 놓아둔 후, 수분 측정기(Aramo-SG moisture checker, Aramhuvis, Gyeonggi-do, Korea)로 pig epidermis 표면

의 수분함량의 변화를 측정하였다. 수분측정기는 epidermis 표면의 capacitance를 측정하며, 본 연구에서는 이를 water holding capacity (WHC)로 표현하였고, 시간에 따른 relative water holding capacity (RWHC)의 변화를 zero time의 capacitance 측정값을 100%로 하여 상대적인 값으로 계산하였다. 이 실험에서 control은 HD와 HD-gal 모두 처리하지 않고, 물만 처리한 시료이다.

2.6. Bacteria에 대한 HD와 HD-gal의 MIC Test

Cell stock vial (-70 °C 보관)로부터 nutrient agar medium으로 만든 petri dish에 각각의 bacteria를 streaking 하여 37°C incubator에서 배양하였다. 그리고, 96 well plate에 HD과 HD-gal이 농도별로 포함된 nutrient agar medium을 만들어 멸균한 뒤 100 μL씩 분주하였다. Nutrient agar medium에서 bacteria가 어느 정도 colony를 형성하고 자라면, colony를 긁어서 1 mL nutrient broth에 풀어서 흡광도 값(optical density at 600 nm)이 *E. coli*의 경우에는 0.016, *S. aureus*의 경우에는 0.03, *E. faecalis*의 경우에는 0.03, *P. aeruginosa*의 경우에는 5.0이 되게 맞추었다. 이때, OD₆₀₀ 값은 nutrient broth로 희석하여 맞추었다. 이 bacteria 희석용액을 nutrient agar medium가 분주된 96 well plate의 배지 표면에 streaking 하여 37°C에서 24 h 배양한다. 그 후, 96 well plate에서의 colony의 성장 여부를 눈으로 관찰 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HD-gal의 최적 합성 조건

Figure 1과 같이 선행연구를 통하여 β-gal 함유하는 재조합 대장균을 이용하여 HD로부터 HD-gal이 합성되는 것을 확인하였다[16]. 최적의 반응 조건을 조사하기 위하여 Figure 2와 같이 β-gal 농도, HD 농도, 반응 pH 그리고 반응 온도 순으로 반응 조건을 최적화하였다. 이때, galactose의 donor인 lactose 농도는 300 g/L로 고정하였다. 이 방법은 본 연구 팀의 galactooligosaccharide 합성 조건의 최적화를 위하여 사용하였던 방법이며[17], TLC를 이용하여 정량적으로 HD 농도 감소를 HD-gal 합성으로 환산하여, HD의 HD-gal로의 % conversion으로 HD-gal 합성양을 표시하여 비교하였다. 그 결과 Figure 2와 같이 β-gal의 농도의 4.8 U/mL, HD의 농도는 75 mM, pH는 7.0, 반응 온도는 37°C가 최적의

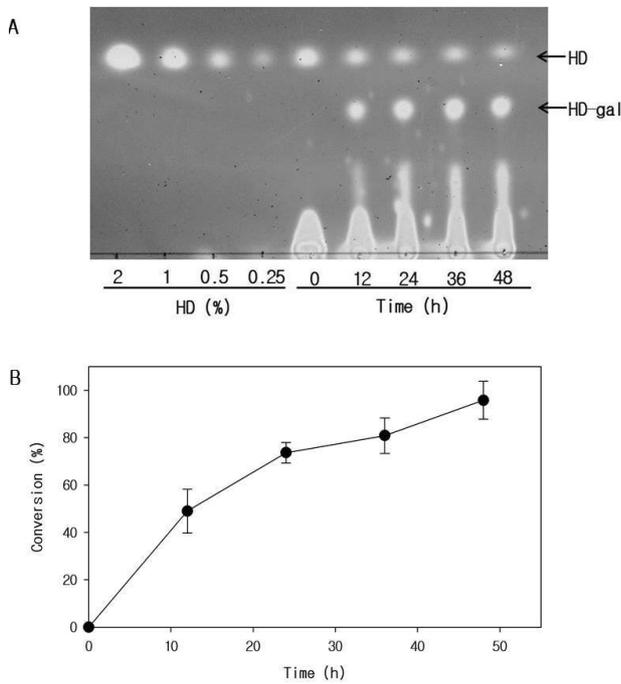


Figure 3. Time-course profiles of HD-gal synthesis under the optimal conditions. (A) TLC analysis during HD-gal synthesis and (B) conversion (%) of HD to HD-gal. All measurements were performed three times ($n = 3$) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

수분에 대한 많은 다양한 측정 원리와 기기들이 소개되고 있다[18,19]. 피부의 capacitance를 측정하는 경우와 함께, conductance를 측정하는 경우와 피부에서의 수분 evaporation을 측정하여 transepidermal water loss (TEWL)를 측정하는 경우도 있다. Conductance 측정 값과 TEWL 측정 값이 서로 비례적으로 직접 연관성이 있다는 것이 보고되고 있으며[20], 피부의 수분 함량이 늘어나는 경우에 더 민감하게 수분함량을 측정할 수 있는 방법이 conductance를 측정하는 경우이고, 반대로 피부의 수분이 감소되는 경우에 더 민감하게 수분함량을 측정할 수 있는 방법이 capacitance를 측정하는 방법이라는 보고도 있다[19]. 그리고, 이 세 가지 원리의 측정이 인체 피부 실험에서 서로 밀접한 연관관계가 있는 수분함량의 측정법으로 알려지고 있다[19]. 피부에서의 TEWL에 대한 mathematical model이 많이 보고되고 있는데[21], 피부에서 수분이 감소되는 profile이 Figure 4와 거의 같은 형태를 이루고 있다. 또한, 가죽에서 수분을 건조시킬 때의 relative humidity에 대한

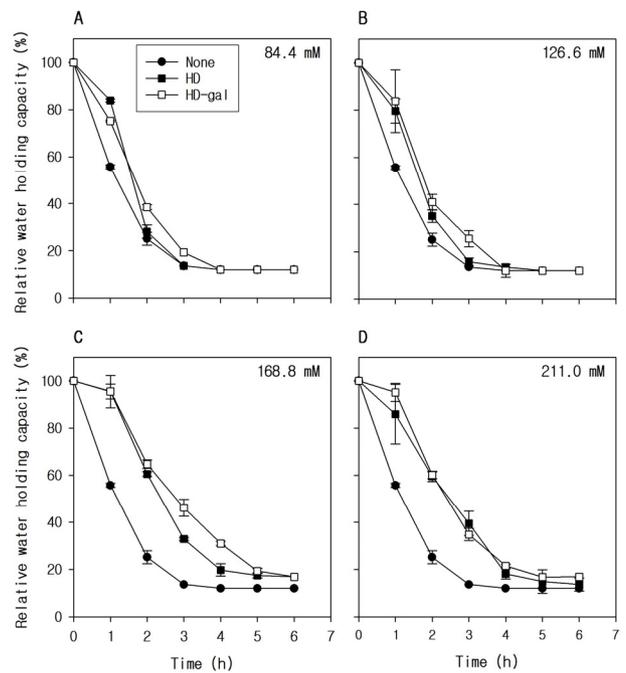


Figure 4. Comparison of water holding capacity of HD and HD-gal using pig epidermis. Concentrations of HD (■) and HD-gal (□) used in this experiment were shown on the upper right corner of each panel; (A) 84.4, (B) 126.6, (C) 168.8, and (D) 211.0 mM. Closed circle (●) indicates the result when neither HD nor HD-gal was used in this experiment. All measurements were performed three times ($n=3$) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

mathematical model에서도 Figure 4와 거의 같은 profile을 보이고 있다[22]. 그래서, 본 연구에서의 Figure 4의 결과는 적어도 pig epidermis에서의 수분 감소와 HD와 HD-gal의 보습력을 어느 정도 잘 표현 해줄 수 있는 근거를 제시하고 있다고 할 수 있다.

HD가 화장품용 방부제로 쓰이기 때문에 galactose가 한 분자 결합한 HD-gal의 방부제로서의 성능 변화에 대하여 조사하여 보았다. 선행연구에서는 CPN-gal과 PE-gal의 경우에 CPN과 PE에 galactose 한 분자가 결합하여도 MIC 값에는 큰 변화가 관찰되지 않았다[7,9]. 그러한 이유로 HD에 한 분자의 galactose가 결합한 HD-gal의 MIC 값을 측정하여 보았다. 이때, HD의 MIC 값도 같이 측정하여 비교하였고, 대상 미생물로 Gram-positive bacteria인 *E. coli*와 *E. faecalis*, Gram-negative bacteria인 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*가 사용되

Table 1. MICs^a of HD and HD-gal

Microorganisms	HD (mM)	HD-gal (mM)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	52.7 ± 0.0 [105.5] ^b	611.0 ± 109.1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	211.0 ± 0.0	240.2 ± 54.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	105.5 ± 0.0 [105.5] ^a	305.5 ± 54.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	211.0 ± 0.0 [211.0] ^a	706.3 ± 126.8

^a All measurements were performed three times (n = 3) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

^b MIC data in bracket from reference number 4.

었다. Table 1과 같이 *E. faecalis*의 경우에는 HD와 HD-gal의 MIC 값이 서로 차이가 없이 항균력을 보였으나, 나머지 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*에서의 HD-gal의 MIC 값은 HD의 MIC 값에 비하여 3배에서 10배 정도 증가하였다. Galactose 한 분자가 HD에 결합하여, HD의 항균력 작용기전에 영향을 준 것으로 생각된다.

HD의 항균력은 bacteria의 세포막 기능의 저해로부터 기인된다고 보고되고 있다[12]. CPN과 PE의 경우에서도 분자 내에 친수성 부분과 소수성 부분이 존재하고 이로 인하여 세포막의 기능을 저해하고, 결국에는 세포의 성장을 억제한다고 알려져 있다[7,9]. 선행연구에 합성한 CPN-gal과 PE-gal의 경우를 관찰해 보면, galactose 한 분자 결합으로 MIC의 변화가 관찰되지 않았다[7,9]. 즉, CPN-gal과 PE-gal의 MIC 값은 CPN과 PE와 차이가 없었다. 그러나, 이 두 분자의 경우에 모두 HD와는 다르게 벤젠링이 분자 내에 존재한다는 차이점이 있다. HD와 비교해 볼 때, 아마도 이러한 분자 구조적인 차이가 CPN-gal과 PE-gal과는 다르게 HD-gal에서 MIC의 변화를 초래했을 것으로 생각된다. HD도 분자도 친수성과 소수성 부분이 존재하고 이로 인하여 세포막에 영향을 주어 세포 성장을 저해하지만, HD-gal의 경우에는 galactose 분자의 결합으로 친수성 부분이 전체 분자에서 차지하는 비중이 증가하여, 원래 HD 분자가 가지고 있는 친수성/소수성 간의 비율 변화로 세포막에 작용하는 저해 작용에 변화를 초래하고, 결국에는 항균력 감소를 유발하지 않았나 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 HD에 galactose 한 분자를 붙이는 transgalactosylation 반응에 대한 최적 조건을 연구하여, 48 h 동안 약 96%의 HD를 HD-gal로 conversion 시킬 수 있었다. HD와 HD-gal을 pig epidermis에 처리하여 두 물질의 보습력을 비교하여 보았는데, 84.4, 126.6, 168.8 mM의 HD나 HD-gal을 처리하였을 경우에 처리 후 3 h에서 4 h까지 HD-gal이 HD 보다 약 10-20% 이상의 RWHC 값이 더 크게 측정되었다. 이 결과로부터 HD에 transgalactosylation 반응으로 결합된 galactose 한 분자로 인하여 HD-gal의 보습력이 상대적으로 HD 보다 더 커졌다는 결론을 얻을 수 있었다. 또한, HD-gal의 MIC 값을 HD와 비교하여 분석하여 본 결과, *E. faecalis*의 경우에는 HD와 HD-gal의 MIC 값이 서로 차이가 없었으나, 나머지 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*에서는 HD-gal의 MIC 값이 HD의 MIC 값에 비하여 3배에서 10배 정도 크게 관찰되었다. 이러한 결과는 HD 분자가 가지고 있는 친수성/소수성 간의 비율 변화로 인한 항균력 감소라고 추론하였다.

Reference

1. V. Jadhav, S. Dhande, and V. Kadam, Cosmetics side effects, *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6**, 327 (2017).
2. G. Deza and A. M. Giménez-Arnau, Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **17**,

- 263 (2017).
3. W. Johnson, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, and F. A. Andersen, Safety assessment of 1, 2-glycols as used in cosmetics, *F. Alan Andersen Int. J. Toxicol.*, **31**, 147S (2012).
 4. E. Lee, S. An, S. -A. Cho, Y. Yun, J. Han, Y. K. Hwang, H. K. Kim, and T. R. Lee, The influence of alkane chain length on the skin irritation potential of 1,2-alkanediols, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **33**, 421 (2011).
 5. E. Lee, S. An, D. Choi, S. Moon, and I. Chang, Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives, *Contact Dermatitis*, **56**(3), 131 (2007).
 6. S. E. Lee, H. Y. Lee, and K. H. Jung, Production of chlorphenesin galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 826 (2013).
 7. S. E. Lee, T. M. Jo, H. Y. Lee, J. Lee, and K. H. Jung, β -Galactosidase-catalyzed synthesis of galactosyl chlorphenesin and its characterization, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**, 1299 (2013).
 8. H. Y. Lee and K. H. Jung, Enzymatic synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 1254 (2014).
 9. K. H. Jung and H. Y. Lee, *Escherichia coli* β -galactosidase-catalyzed synthesis of 2-phenoxyethanol galactoside and its characterization, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**, 365 (2015).
 10. Y. O. Kim and K. H. Jung, Enzymatic synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing recombinant *Escherichia coli*, *J. Life Sci.*, **26**, 608 (2016).
 11. D. Melisi, A. Curcio, E. Luongo, E. Morelli, and M. G. Rimoli, D-Galactose as a vector for prodrug design, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**, 2288 (2011).
 12. E. B. Herman, G. J. Haas, W. H. Crosby, and C. J. Cante, Antimicrobial action of short chain alcohols and glycols, *J. Food Saf.*, **2**, 131 (1980).
 13. K. A. Fitzgerald, A. Davies, and A. D. Russell, Mechanism of action of chlorhexidine diacetate and phenoxyethanol singly and in combination against gram-negative bacteria, *Microbios.*, **70**(284-285), 215 (1992).
 14. S. Langsrud, K. Steinhauer, S. L uthje, K. Weber, P. Goroncy-Bermes, and A. L. Holck, Ethylhexylglycerin impairs membrane integrity and enhances the lethal effect of phenoxyethanol, *PLoS ONE*, **11**(10), e0165228. doi:10.1371/journal.pone.0165228 (2016).
 15. K. H. Jung, Enhanced enzyme activities of inclusion bodies of recombinant β -galactosidase via the addition of inducer analog after L-arabinose induction in the *araBAD* promoter system of *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 434 (2008).
 16. Y. O. Kim and K. H. Jung, β -Galactosidase-catalyzed synthesis of 1, 2-hexanediol galactoside and its purification using ethyl acetate extraction followed by silica gel chromatography, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **33**, 498 (2016).
 17. S. E. Lee, H. B. Seo, H. J. Kim, J. H. Yeon, and K. H. Jung, Galactooligosaccharide synthesis by active β -galactosidase inclusion bodies-containing *Escherichia coli* cells, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1151 (2011).
 18. F. Kong, C. Galzote, and Y. Duan, Change in skin properties over the first 10 years of life: a cross-sectional study, *Arch. Dermatol. Res.*, **309**, 653 (2017).
 19. C. W. Blichmann and J. Serup, Assessment of skin moisture; measurement of electrical conductance, capacitance and transepidermal water loss, *Acta. Derm. Venereol.*, **68**, 284 (1988).
 20. H. Tagami, Electrical measurement of the hydration state of the skin surface *in vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **171**, 29 (2014).
 21. F. Gioia and L. Celleno, The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin, *Skin Res. Technol.*, **8**, 176 (2002).
 22. A. K. Haghi, A mathematical model of the drying process, *Acta Polytech.*, **41**, 21 (2001).