

대장균 베타-갈락토시데이즈를 이용한 Phenylethanol Galactoside 합성 조건의 최적화

정경환[†]

한국교통대학교 생명공학전공, 교수
(2020년 12월 14일 접수: 2021년 2월 16일 수정: 2021년 2월 17일 채택)

Optimal Conditions for Phenylethanol Galactoside Synthesis using *Escherichia coli* β -Galactosidase

Kyung-Hwan Jung[†]

Major in Biotechnology, Korea National University of Transportation,
Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Republic of Korea
(Received December 14, 2020; Revised February 16, 2021; Accepted February 17, 2021)

요약 : Phenylethanol (PhE)에서 야기되는 피부 부작용 문제를 극복하기 위한 대안으로 phenylethanol galactoside (PhE-gal)에 대하여 연구하였다. 그 중에서도 대장균 효소 β -galactosidase (β -gal)을 이용하여 PhE로부터 PhE-gal를 합성하는 반응의 최적 조건에 대하여 조사하였다. 그리고, 용매 분획연구를 수행하여 PhE-gal의 특성도 조사하였다. 반응조건 중에서 반응액의 β -gal 농도, PhE 농도, 반응액의 pH, 그리고 온도에 대하여 조사한 결과, 최적 β -gal의 농도는 0.45 U/ml, 최적 반응물 PhE의 농도는 1.0%, 최적 반응액의 pH는 8.0, 최적 반응온도는 40°C 였다. 그리고, 최적 반응조건에서 48 시간까지의 반응을 관찰하였는데, 약 81.9 mM의 PhE로부터 약 47.4 mM의 PhE-gal이 합성되었고, PhE로부터 PhE-gal로의 전환수율은 약 57.9% 정도였다. 또한, PhE와 PhE-gal이 포함된 반응물을 용매 EA와 MC로 분획한 결과, 물 층으로 대부분의 PhE-gal이 분획 되었고, 용매 층으로는 PhE가 분획 되었다. 그러나, 물 층으로의 PhE-gal의 분획이 용매 MC를 사용할 때, 더 분명하고 명확하게 나타났으며, 용매 EA를 이용한 분획에서는 명확히 물 층으로 PhE-gal이 분획 되지 않았다. 앞으로, PhE-gal을 화장품에 사용할 수 있는 첨가물(방부제)로 개발하기 위한 후속연구를 계속 진행할 예정이다.

주제어 : 페닐알코올 갈락토사이드, 베타-갈락토시데이즈, 갈락토오즈 전달반응, 최적화 연구, 용매 분획

Abstract : To circumvent the skin problem from phenylethanol (PhE), we have studied on the enzymatic synthesis of phenylethanol galactoside (PhE-gal) as an alternative to PhE. Base on the previous study, we optimized the reaction conditions for PhE-gal synthesis from PhE using *E. coli* β -galactosidase (β -gal). The optimal amount of β -gal, PhE concentration, pH, and temperature

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

for PhE-gal synthesis were 0.45 U/ml, 1%, 8.0, 40°C, respectively. Under these conditions, about 81.9 mM PhE was converted into about 47.4 mM PhE-gal, in which the conversion yield was about 57.9%. Meanwhile, when the reaction mixture containing PhE and PhE-gal was mixed and fractionated with water-immiscible solvent (EA or MC), it was observed that PhE-gal was distributed in water phase, and PhE was distributed in solvent phase. Additionally, PhE-gal was clearly distributed into water phase when MC was used, but PE-gal was not when EA was used. In the future, we are planning to carried out the continuing study on developing an alternative cosmetic preservative using PhE-gal.

Keywords : Phenylethanol galactoside, β -Galactosidase, Transgalactosylation, Optimization, Solvent fractionation

1. 서론

2-phenylethanol (PhE, CAS number: 98-85-1, Chemical formula: $C_8H_{10}O$) 은 화장품과 식품에 사용되는 안전한 물질로 보존제와 방향성분으로서 화장품과 식품에 첨가물로 사용되어 지고 있다. 연관된 독성문제도 없는 것으로 보고되고 있으나[1,2], 방향 성분에 대한 지속적인 부작용 문제 제기 때문에 PhE에 대한 부작용 가능성도 거론되고 있다[3,4,5]. 그래서 본 연구팀은 제기될 가능성이 있는 이러한 PhE의 문제에 대한 대안으로 PhE의 galactoside 유도체(phenylethanol galactoside, PhE-gal)에 대하여 관심을 가지게 되었다. 이미 본 연구팀의 선행연구에서 chlorphenesin (CPN)[6,7], phenoxyethanol (PE)[8,9], 1, 2-hexanediol (HD) [10,11]의 galactoside 유도체를 대장균 효소(*Escherichia coli* β -galactosidase)를 사용하여 합성하는 연구를 수행하였다. 이를 근거로 PhE에 galactose 한 분자를 결합시켜 PhE의 galactoside 유도체

(phenylethanol galactoside, PhE-gal)를 합성하는 연구를 수행하여(Fig. 1), PhE-gal의 합성을 NMR (1H - and ^{13}C -) spectroscopy와 mass spectrometry를 이용하여 확인하였다[12].

보다 안전한 PhE-gal이 될 수 있다는 실험적인 근거는 chlorphenesin galactoside (CPN-gal)[7], phenoxyethanol galactoside (PE-gal)[9], 1, 2-hexanediol galactoside (HD-gal)[13]와 같은 유도체 분자와 CPN, PE, HD와의 인간 피부세포 독성 비교연구에서 이미 밝힌 바 있다. 이 때, galactoside 유도체에서 세포 독성이 감소를 실험적으로 관찰할 수 있었기 때문에 본 연구팀에서도 이를 근거로 PhE-gal 합성에 대한 연구를 수행할 수 있었다.

본 연구에서는 대장균에서 발현된 β -galactosidase (β -gal)를 사용하였으며, PhE의 galactoside 유도체 PhE-gal을 합성 조건을 최적화 및 특성 연구를 수행하였다. 선행연구에서 PhE-gal의 합성을 확인하였기 때문에 효율적인 합성조건의 확인을 위하여 합성조건의 최적화를

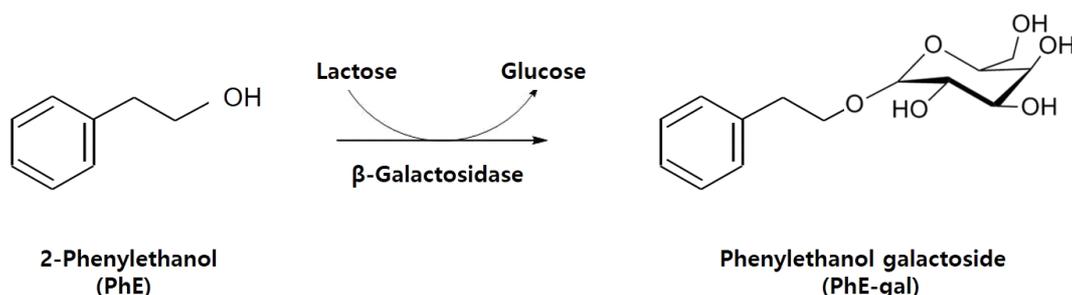


Fig. 1. Enzymatic synthesis of PhE-gal using β -gal.

수행하였으며, 앞으로 이러한 연구 결과를 바탕으로 보다 안전하고, 부작용 없는 화장품 첨가 물질 연구를 계속하기 위하여, 계속적으로 PhE-gal의 분리/정제 연구, 항균력 검증시험과 피부세포 독성 연구 순으로 연구를 진행할 예정으로 있다.

2. 실험방법

2.1. 시약

2-Phenylethanol은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, TLC (thin-layer chromatography) plate는 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Germany)의 precoated plates SIL HD UV₂₅₄ (MN809222)를 사용하였다. 기타 본 연구에 사용한 시약들은 reagent-grade를 사용하였다.

2.2. β-Gal을 생산하는 재조합 대장균

β-Gal을 생산하는 재조합 대장균, 그리고 발현과 관련된 프로모터 시스템에 대하여서는 선행 연구에 자세히 기술하였다[14]. 그리고, 재조합 대장균의 배양하여 β-gal을 얻는 방법에 대하여서도 선행연구에서 자세히 기술하였다[14].

2.3. PhE-gal 합성 최적화 연구

PhE-gal 합성 조건 최적화 연구는 50 ml conical tube에서 수행하였다. Lactose, β-gal (대장균 세포), PhE를 50 mM phosphate buffer에 녹인 후, shaking incubator (100 rpm)에서 36 시간 동안 반응시켜 PhE-gal을 합성을 확인하였다.

2.4. TLC 분석

20 × 10 cm TLC plate에 1.0 μl 시료를 loading하고 이동상 (Ethyl acetate : Methanol : Distilled water = 17 : 2 : 1, (v/v))으로 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 분간 말려서 밴드를 확인하였다. PhE의 정량 분석을 위하여 선행연구에서 제시한 방법에 근거하여 TLC plate상의 이미지를 스캔한 후, AlphaEase FC software (Alpha Innotech, San Leonardo, CA, USA)를 이용하여 band의 면적을 분석하였다. PhE의 농도를 분석해야 하는 경우에는 선행연구의 방법과 같이 표준농도(0.125~1.0%)의 PhE의 band 면적을 분석하여, PhE 농도와 band 면적과의 직선관계식을 구한 후, 이를 이용하여 반응물에서의 PhE 농도를 계산하였다 [15]. Table 1은 본 연구에서 PhE 농도를 구하기 위하여 사용한 PhE 농도와 TLC 상의 PhE의 band 면적과의 상관 관계를 보여주고 있다. 그리고, PhE-gal 합성을 위한 최적조건을 구하기 위한 실험에서는 TLC 상의 PhE-gal 이미지 band의 면적을 구한 후, 서로 상대적인 면적 값을 비교하여 분석하였다. 반응물에서 PhE-gal의 합성 양은 PhE로부터 PhE-gal로 모두 conversion 되었다고 가정하고 PhE 감소량으로부터 계산하였으며, PhE로부터 PhE-gal로의 전환 수율 (conversion, %)은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Conversion (\%)} = (\text{PhE}_0 - \text{PhE}_t) / \text{PhE}_0$$

(PhE₀ = 반응 초기의 PhE 양, PhE_t = t 시간에 PhE 양)

Table 1. Relationship between PhE concentrations and PhE's band areas on TLC (p-value between two experiments' areas from Exp. 1, 2 and 3 were 0.868~0.951).

PhE (%)	Area ^a (arbitrary unit)			Average and standard deviation of areas ^b
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
0.125	250	150	120	173.3±68.1
0.250	450	360	521	443.6±80.7
0.500	675	850	798	774.3±89.9
1.000	1131	1300	999	1143.3±150.9

^aTLC analysis of standard samples (0.125~1.0% PhE) was carried out three times.

^bThese were calculated from three data at the same PhE concentration. Using these values, the linear regression of PhE(%) vs. area was carried out (slope; 1057.3, intercept; 138.0, regression coefficient; 0.952).

2.5. 용매를 이용한 PhE-gal의 분획

PhE-gal을 분획하기 위하여 용매(water-immiscible solvent)로서 ethyl acetate (EA) 혹은 methylene chloride (MC)를 사용하였다. 2 ml microtube에 500 μ l 반응액과 500 μ l 용매(EA 혹은 MC)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 μ l 용매를 넣고, vortexing 하고, 층 분리를 시키고, 용매 층을 제거한다. 이 때, 이러한 분획 방법을 총 4회의 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PhE-gal의 최적 합성 조건

최적 조건이 아닌 선행연구의 합성 조건[12]에서 PhE-gal의 합성을 먼저 확인하여 보았다(Fig. 2). 이 때, 합성은 50 mM phosphate buffer (pH 8.0)를 이용하였으며, 50 ml conical tube에서 300 g/l lactose, 0.96 U/ml β -gal, 1% PhE를 녹인 후, shaking incubator (40°C, 100 rpm)에서 24 시간 동안 반응시켜 수행하였다. 그리고, 본 연구에서는 최적조건을 찾기 위하여 반응 용액의 조건에서 β -gal 농도, PhE 농도, pH, 그리고 온도에 대하여 조사하였다. 이 조건은 이미 선행연구에서 조사한 변수이며, 선행연구와 같은 방법으로 수행하였다[16,17].

최적화를 위한 이러한 변수에 대한 실험 결과는 Fig. 3에서 볼 수 있다. 모든 조건에서 36 시간까지 합성반응을 진행하여 반응액에 대한 TLC 분석을 실시하였다. 이 때, 합성된 PhE-gal의 농도를 상대적으로 비교하였다. Fig. 3A에서는 반응액의 β -gal의 농도(0.09~0.9 U/ml), Fig. 3B에서는 반응액에서 반응물 PhE의 농도(0.25~1.0%), Fig. 3C에서는 반응액의 pH(6.5~8.0), Fig. 3D에서 반응온도(25~40°C)에 대하여 조사하였다. 이러한 조건들의 변화에 대한 상대적인 PhE-gal의 합성량을 Fig. 4에 표시하였다. 그 결과, PhE-gal을 합성하기 위한 최적 조건을 찾을 수 있었는데, 반응액에서 최적 β -gal의 농도는 0.45 U/ml 였고, 최적 반응물 PhE의 농도는 1.0% 였고, 최적 반응액의 pH는 8.0이었고, 최적 반응온도는 40°C 였다. 이 후, 이 반응조건을 최적 반응조건으로 하여 모든 PhE-gal의 합성반

응을 수행하였다.

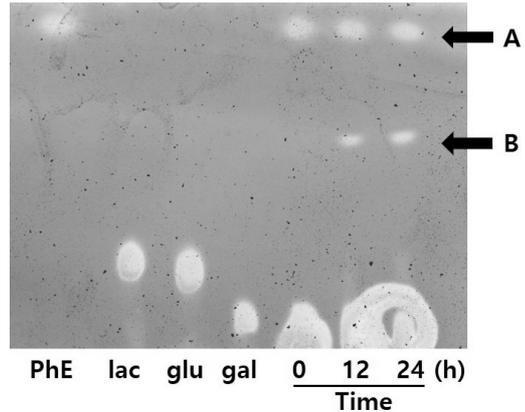


Fig. 2. TLC analysis for PhE-gal synthesis using β -gal, in which zero-, 12-h, and 24-h samples were analyzed. PhE, lac, glu, and gal represent 1% standards of phenylethanol, lactose, glucose, and galactose, respectively. Arrow A and B indicate PhE and PhE-gal, respectively.

3.2. 최적 반응조건에서 PhE-gal의 합성

최적 반응조건에서 PhE-gal 합성반응을 수행한 후, TLC로 시간에 따른 PhE-gal, PhE의 변화를 48 시간까지 관찰하여 보았다(Fig. 5). 이 때, 세 번의 합성반응을 수행하였으며, 그 중 하나의 결과를 Fig. 5에 표시하였고, 이 세 번의 합성반응 결과로부터 PhE-gal의 합성과 PhE에서 PhE-gal로의 전환수율 등을 분석하여 보았다(Fig. 6). 반응 후, 48 시간까지 약 81.9 mM의 PhE로부터 약 47.4 mM의 PhE-gal이 합성되었고, PhE로부터 PhE-gal로의 전환수율은 약 57.9% 정도였다. 한편, 본 연구팀의 선행연구에 의하면, CPN (chlorphenesin), PE (phenoxyethanol), HD (1, 2-hexanediol), 그리고 BzOH로부터 CPN-gal, PE-gal, HD-gal, 그리고 BzO-gal의 전환 수율은 각각 약 64-67% [6,7], 약 37.5-50% [8,9], 약 96% [16], 그리고 약 72% [17]로 보고되고 있다. 본 연구에서의 PhE에서 PhE-gal로의 전환수율 약 57.9%는 CPN, HD, 그리고 BzOH가 galactoside 유도체로 전환되는 수율보다는 낮고, PE가 galactoside 유도체를 전환되는 수율보다는 비슷하거나 약간 높은 값이다. 아마도, PE와 PhE 분자의 구조적인 유사성 때문인 것으로 생각된다.

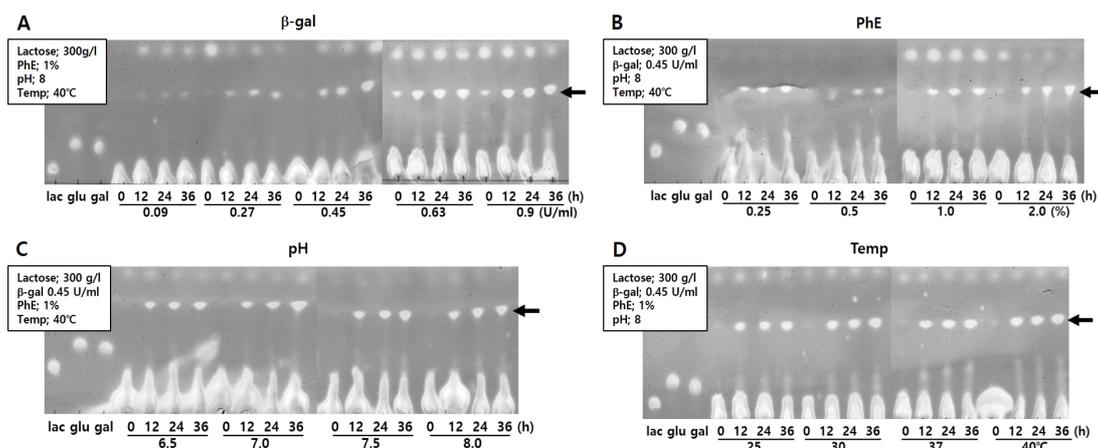


Fig. 3. Effects of (A) the amount of β -gal, (B) PhE concentration, (C) pH, and (D) temperature on PhE-gal synthesis. The samples collected at 0, 12, 24, and 36 h were used for TLC analysis. The reaction conditions are shown within the box in each chromatogram. Arrows indicate the synthesized PhE-gal. Standards (1%) of lactose, glucose, and galactose were shown by lac, glu, and gal, respectively.

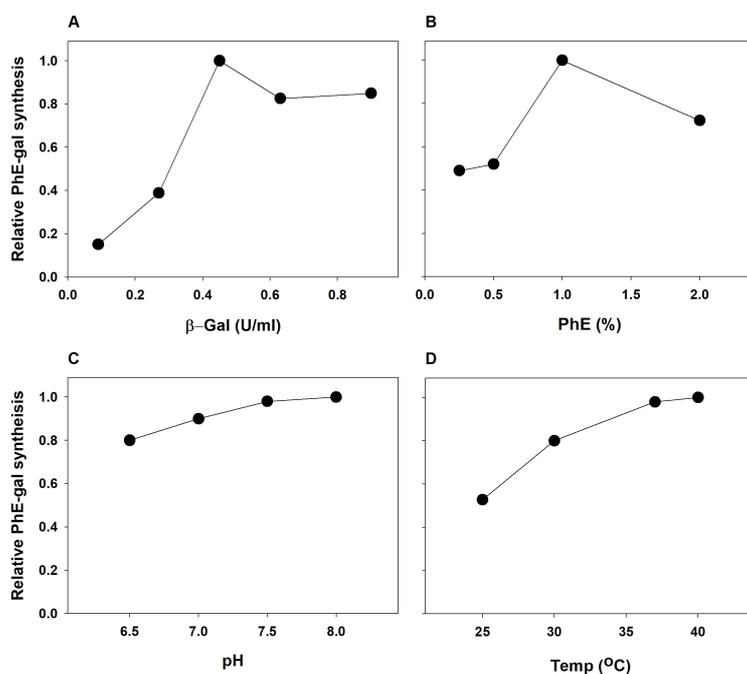


Fig. 4. Optimal conditions for PhE-gal synthesis by β -gal. Values of relative PhE-gal synthesis were calculated on the basis that the maximum synthesis of PhE-gal was 1.0 under each condition, in which PhE-gal syntheses were measured as scanned TLC spot areas. (A) Optimization of the amount of β -gal. (B) Optimization of PhE concentration. (C) pH optimization. (D) temperature optimization. All measurements were conducted using 36-h samples from Fig. 3.

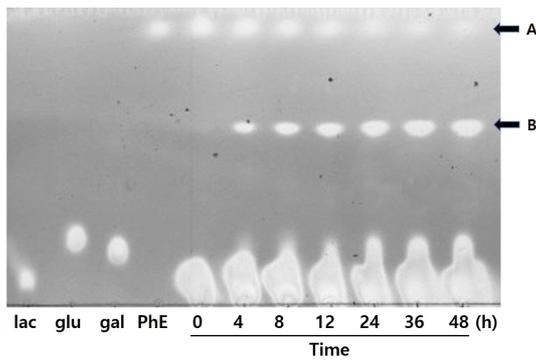


Fig. 5. TLC analysis of PhE-gal synthesis under optimal conditions. PhE, lac, glu, and gal indicate 1% standards of PhE, lactose, glucose, and galactose, respectively. Arrow A and B indicate PhE and PhE-gal, respectively.

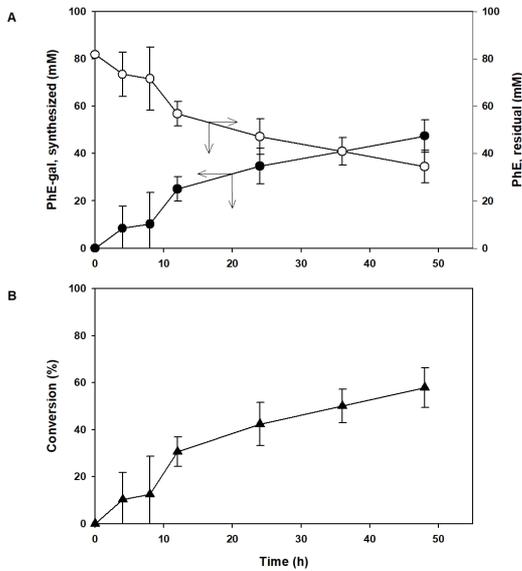


Fig. 6. (A) Time-course profiles of PhE and PhE-gal under optimal conditions for PhE-gal synthesis using β -gal. (B) Percent conversion of PhE to PhE-gal. All measurements were performed three times ($n=3$) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

3.3. 반응물에서 PhE와 PhE-gal의 분획

PhE로부터 PhE-gal이 합성된 반응물에는 반응하지 않고 남아 있는 PhE도 같이 포함되어 있다. 그러므로, 용매를 이용하여 이러한 반응액을 분획하여 PhE와 PhE-gal의 특성을 확인하는 실험을 실시하였다. Fig. 7에서와 같이 두 가지 용매 EA (density=0.902 g/ml)와 MC (density=1.33 g/ml)를 사용하여 반응물을 분획하였다. EA는 물과 섞였을 때, 위 층에 존재하고, MC는 물과 섞였을 때, 아래 층에 존재한다. Fig. 7A와 7B에서 보여지듯이 두 가지 용매를 사용하여 4회 연속으로 물 층을 모아서 분획 하였을 때, 물 층에는 PhE-gal이 분획 되었고, 반대로 PhE는 용매 층으로 분획 되었다. 이러한 현상은 galactose 한 분자가 결합된 PhE-gal이 PhE 보다 더 친수성 성질을 가지게 되어서 나타나는 현상에서 오는 것으로 생각된다. EA와 MC의 분획과정을 보면, 첫번째 분획 과정에서 반응하지 않은 PhE가 용매 층으로 대부분 분획 되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, 물 층으로의 PhE-gal의 분획이 MC에서 더 분명하고 명확하게 나타났다(Fig. 7B). EA를 이용한 분획에서는 EA 층에 계속해서 PhE-gal이 남아 있고, 명확히 물 층으로 PhE-gal이 분획 되지 않았다(Fig. 7A).

반응물의 PhE-gal이 용매 MC로 분획 되는 현상을 이용하여, 순수 정제과정 전단계의 전처리과정에서 이러한 용매를 이용한 분획을 실시한다면 정제 효율 향상에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구팀에서 그 동안 합성 연구를 수행하여 얻은 CPN-gal [18], PE-gal [9,18], HD-gal [19] 분자 들도 galactose 결합으로 CPN, PE, HD에 비하여 보다 친수성 성질을 가지는 특성을 보였다. 그리고, 정제과정에 이러한 특성을 이용하여 용매 분획을 정제 전의 전처리 과정으로 사용하였다. 본 연구팀도 앞으로 PhE-gal 정제를 위하여 용매를 이용한 전처리 과정을 사용할 예정이다.

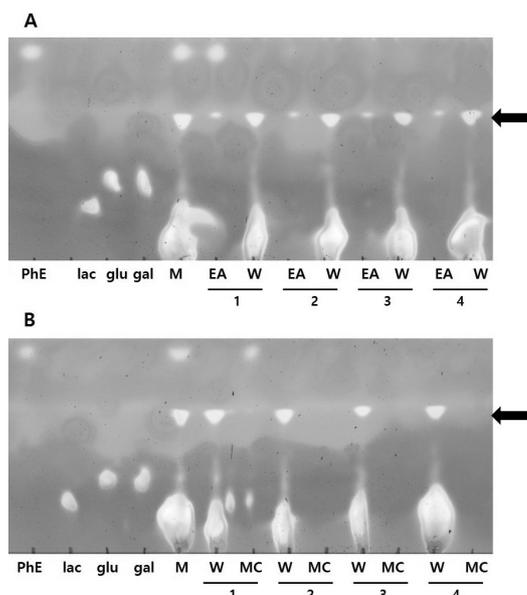


Fig. 7. TLC analysis after the extraction of reaction mixture using (A) EA and (B) MC. EA and MC indicate the phases of and ethyl acetate and methylene chloride, respectively, after the extraction of reaction mixture. W indicates water phase after extraction. M indicates the reaction mixture at 48 h. Number 1, 2, 3, and 4 represent the first, second, third, and fourth extraction, respectively, using EA and MC. PhE, lac, glu, and gal indicate 1% standards of PhE, lactose, glucose, and galactose, respectively.

4. 결론

대장균 β -gal을 이용한 PhE-gal 합성 반응의 최적 조건(반응액의 β -gal 농도, PhE 농도, 반응액의 pH, 그리고 온도)에 대하여 연구하였다. PhE-gal을 합성하기 위한 최적 β -gal의 농도는 0.45 U/ml, 최적 반응물 PhE의 농도는 1.0%, 최적 반응액의 pH는 8.0, 최적 반응온도는 40°C 였다. 이 반응조건에서 48 시간까지 약 81.9 mM의 PhE로부터 약 47.4 mM의 PhE-gal이 합성되었으며, PhE로부터 약 57.9% 정도가

PhE-gal로 전환되었다. 또한, PhE와 PhE-gal이 들어있는 합성 반응물을 용매 EA와 MC로 분획하였을 때, 물 층으로 대부분의 PhE-gal이 분획되었고, 용매 층으로는 PhE가 분획되었다. 그러나, 물 층으로의 PhE-gal의 분획이 용매 MC에서 더 분명하고 명확하게 나타났다. 앞으로, 이러한 PhE-gal을 합성하기 위한 최적 반응조건과 PhE-gal의 특성 결과를 기반으로 경제성 있는 생산 수율로 PhE-gal을 합성할 수 있는 반응시스템을 구축할 예정이며, PhE-gal을 화장품 첨가물(방부제)로 개발하기 위한 정제연구, 향균력 시험연구, 그리고 피부세포 독성연구 등을 순차적으로 수행할 예정이다.

감사의 글

본 연구를 위하여 한국교통대학교 생명공학전공 안승혜, 이해원 학생이 많은 도움을 주었습니다.

References

1. J. Scognamiglio, L. Jones, C.S. Letizia, A.M. Api, "Fragrance material review on phenylethyl alcohol", *Food and Chemistry Toxicology*, Vol.50, S224-S239, (2012).
2. D. Belsito, D. Bickers, M. Bruze, P. Calow, M. Dagli, A.D. Fryer, H. Greim, J.H. Hanifin, Y. Miyachi, J.H. Saurat, I.G. Sopes, "A toxicologic and dermatologic assessment of aryl alkyl alcohols when used as fragrance ingredients", *Food and Chemistry Toxicology*, Vol.50, (Suppl.2), S52-S99, (2012).
3. K.J. Oritiz, J.A. Yiannias, "Contact dermatitis to cosmetics fragrances, and botanicals", *Dermatologic Therapy*, Vol.17, No.3, pp. 264-271, (2004).
4. P.L. Scheinman, "Allergic contact dermatitis to fragrance: A review", *American Journal of Contact Dermatitis*, Vol.7, No.2, pp. 65-76, (1996).

5. A.C. de Groot, P.J. Frosch, "Adverse reactions to fragrances; A clinical review", *Contact Dermatitis*, Vol.36, No.2, pp. 57-86, (1997).
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. Y.O. Kim, K.H. Jung, "Enzymatic synthesis of 1, 2-hexandiol galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing recombinant *Escherichia coli*", *Journal of Life Science*, Vol.26, No.5, pp. 608-613, (2016).
11. Y.O. Kim, H.Y. Lee, K.H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *Journal of Korean Oil Chemists' Society*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
12. H.Y. Lee, K.H. Jung, "NMR spectroscopy and mass spectrometry of phenylethanol galactoside synthesized using *Escherichia coli* β -galactosidase", *Journal of Korean Applied Science and Technology*, Vol.37, No.5, pp. 1323-1329, (2020).
13. J.S. Kim, K.H. Jung, "Cytotoxic effects of 1, 2-hexanediol and 1, 2-hexanediol galactoside on HaCaT", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.44, No.3, pp. 343-347, (2018).
14. 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*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.18, No.3, pp. 434-442, (2008).
15. S.E. Lee, W.S. Choi, D.H. Kang, H.Y. Lee, K.H. Jung, "Improvement in thin-layer chromatography in a quantitative assay of glycerol in biodiesel", *Journal of Life Science*, Vol.23, No.4, pp. 537-541, (2013).
16. Y.O. Kim, K.H. Jung, "Water-holding capacity and antimicrobial activity of 1, 2-hexanediol galactoside synthesized by β -galactosidase", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.43, No.4, pp. 373-379, (2017).
17. K.H. Jung, "Enzymatic synthesis of benzyl alcohol galactoside using *Escherichia coli* β -galactosidase", *Journal of Korean Applied Science and Technology*, Vol.36, No.2, pp. 582-590, (2019).
18. K.H. Jung, "Purifications of phenoxyethanol galactoside and chlorphenesin galactoside using solvent extraction followed by gel chromatography", *Journal of Oil and Applied Science*, Vol.34, No.4, pp. 954-961, (2017).
19. 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 Korean Oil Chemists' Society*, Vol.33, No.3, pp. 498-506, (2016).