

생합성된 galactosylated 2-phenoxyethanol의 피부 투과도

김수홍^{1,*} · 권순범¹ · 김준섭² · 문기성² · 정경환^{2,†} · 이향렬^{2,†}

¹한국교통대학교 식품생명학부 생명공학전공, 학생

²한국교통대학교 식품생명학부 생명공학전공, 교수

(2023년 12월 26일 접수: 2024년 1월 29일 수정: 2024년 2월 5일 채택)

Skin permeability of the biosynthetic galactosylated 2-phenoxyethanol

Su-Hong Kim^{1,*} · Sun-Beom Kwon¹ · Jun-Sub Kim² · Gi-Seong Moon²
Kyung-hwan Jung^{2,†} · Hyang-Yeol Lee^{2,†}

¹Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Student

²Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Professor

(Received December 26, 2023; Revised January 29, 2024; Accepted February 5, 2024)

요약 : 화장품 소재는 안전성이 무엇보다 중요시된다. 화장품에 사용되는 기존의 보존제인 PE에 대장균 효소 β -gal을 이용하여 안전성이 증가된 PE-gal을 생합성하였다. 화장품 소재로 사용하기 위해 생합성된 생성물인 PE-gal의 피부 흡수도를 기존의 보존제인 PE와 비교하기 위해 Franz Diffusion cell Assay 시스템을 이용하여 경피투과도를 측정하였다. 같은 질량농도의 시료를 사용하였을 때 PE의 Flux 값, Kp 값은 시간이 지날수록 증가하는 것으로 나타났으나 PE-gal은 투과도를 측정할 수 있을 만큼 투과되지 못하였다. 이는 PE의 피부투과도가 생합성된 PE-gal 배당체보다 높다는 것을 나타낸다. Marzulli 등에 따라 Kp 값을 이용하여 투과 정도를 확인하였을 때 PE의 투과속도는 1mg/mL의 농도에서 느림(slow)으로 측정되었다. 따라서 배당체 형태의 PE-gal은 PE에 비해 경피 투과도가 현저히 낮게 나타났다.

주제어 : 프란츠 경피 흡수 실험, β -갈락토시다아제, 2-페녹시에탄올, 갈락토실-2-페녹시에탄올, 생물 전환

Abstract : The safety of cosmetic ingredients is considered paramount. In order to enhance safety, a novel preservative, PE-gal, was bio-synthesized by utilizing the *Escherichia coli* enzyme β -galactosidase on the conventional preservative 2-phenoxyethanol (PE). The skin absorption of the bio-synthesized product, PE-gal, intended for use in cosmetics, was evaluated for permeability using the Franz Diffusion Cell Assay system, comparing it with the conventional preservative PE. When using samples of the same mass concentration, the Flux and Kp values of PE increased over time, indicating a gradual increase in permeability. However, PE-gal did not exhibit sufficient permeability to measure. This suggests that the skin permeability of PE is higher than that of the PE-gal saccharide. According

[†]Corresponding author

(E-mail: khjung@ut.ac.kr, hyl@ut.ac.kr)

to Marzulli et al., when confirming the degree of permeation using Kp values, the permeation rate of PE was measured as “slow” at a concentration of 1mg/mL. Thus, the transdermal permeability of the divided form of PE-gal was significantly lower compared to PE.

Keywords : Franz Diffusion Cell Assay, β -galactosidase, 2-phenoxyethanol, galactosylated 2-phenoxyethanol, bioconversion

1. 서론

화장품 보존제는 제품 내의 미생물 성장을 억제하고 소비자의 안전을 보장하기 위한 핵심 성분이다. 보존제들은 주로 균의 세포벽이나 세포막에 영향을 미치는 방식으로 작용하며 이러한 작용은 균의 세포 분열을 방해하고 균의 대사를 억제함으로써 미생물의 증식을 막는다. 가장 흔하게 사용되는 보존제로는 paraben, 2-phenoxyethanol (PE), chlorphensin 등이 있다[1]. 보존제의 효과는 사용된 농도에 크게 의존하는데 너무 낮은 농도에서는 살균 효과가 충분하지 않을 수 있고 반대로 너무 높은 농도는 소비자에게 독성과 알러지 문제를 유발할 수 있다. 다양한 화장품 분야에 사용되는 보존제의 독성과 알러지 문제를 해결하기 위한 방법으로 galactose를 기존의 살균제에 생합성을 통해 도입하는 시도가 있어 왔다. 본 연구팀은 가수분해 효소를 이용하여 2-phenoxyethanol에 galactose 한 분자를 도입한 2-phenoxyethanol galactoside (PE-G)[2]를 포함한 다양한 보존제들을 생합성하고 그 구조를 확인하였다[3-6]. 이러한 보존제 배당체가 인간 피부 세포에 적용하였을 때 세포에 대한 독성이 현저하게 감소하였다. 당을 도입할 경우 보습력의 증가도 예측할 수 있다[2,7].

의약품이나 화장품에서 사용된 화합물 성분에 대한 효과는 그 성분이 피부에 투과되어 어떻게 작용하는지에 크게 의존한다. 피부투과도 측정은 특정 화합물이 피부층을 통과하여 목표 조직이나 세포에 도달할 수 있는 능력을 평가하므로 제품의 효과를 미리 예측하는데 도움이 된다[8-9]. 또한 피부 흡수 연구는 화장품 및 의약품 분야에서 중요한 역할을 하며, 특히 화장품에 사용되는 화합물의 안전성과 성능을 평가하는 데 중요한 정보를 제공하기도 한다. 성분에 따라 피부에 쉽게 투과되어 우수한 효능을 나타내어야 하는 성분이 있는 반면, 피부에 투과되지 않는 것이 나

은 성분도 첨가된다. 보존제의 경우 대부분 피부 표피에 상주하는 피부유해균에 작용한다. 따라서 일반적인 보존제의 경우 피부장벽을 투과하여 인체 내부에 축적이 되는 것은 화장품 소재로서 바람직해 보이지 않으므로 피부 투과도가 낮은 화장품용 보존제의 개발이 요구된다[10-13].

본 실험에서는 2-phenoxyethanol (PE)와 생합성된 2-phenoxyethanol의 배당체인 PE-G를 생합성하였다. 이렇게 생합성된 PE-G와 기존에 상용화 살균제로 사용되고 널리 사용되고 있는 PE와의 피부 흡수 특성에 대한 비교 실험을 수행하였다. 투과도 측정을 위해 Franz Diffusion cell Assay와 HPLC를 이용하여 피부 흡수 특성을 조사하였다. 이 결과를 바탕으로 PE와 PE-G의 피부투과 특성에 대해 알아보고 새로운 화장품 보존제로서의 사용 가능성에 대해 살펴보고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

실험에 사용된 2-phenoxyethanol (PE)은 Fluka사의 제품을 이용하였다. PBS 용액은 Phosphate buffered saline tablet 1정(Sigma-Aldrich, USA)을 200mL 3차 증류수에 녹여 사용했다. TLC는 Merck Millipore사의 DC kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore, USA)를 사용하였다. 2-Phenoxyethanol galactoside (PE-Gal)을 정제하기 위해 사용한 silica gel은 Merck millipore사의 silica gel 60 (0.040~0.063 mm)를 사용하였다. 피부투과도 실험에 사용된 Membrane은 Strat-M™ Membrane의 Transdermal Diffusion Test Model을 이용하였다. 무수 Ethyl alcohol와 Methyl alcohol은 대정 (Siheung, Korea)사의 제품을 사용하였고, Acetonitrile

(99.9%)는 삼전 (Seoul, Korea)사의 제품을 사용하였다. Franz Diffusion Cell Assay 기기는 비엔 씨테크 (Daejun, Korea)에서 제공받았고, 분석을 위해 사용된 HPLC는 Waters사의 e2695 모델을 사용했다.

2.2. β -Galactosidase를 이용한 PE-Gal 합성

β -Gal을 생산하는 재조합 대장균은 대장균의 araBAD 프로모터 시스템에 의하여 발현이 조절되는 pBAD/Myc-His/lacZ vector(7.2 kb) (invitogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 *E. coli* MC1061를 발현 숙주로 하여 β -Gal을 발현하여 확보하였다. PE-Gal 생합성을 위해 250mL 삼각플라스크에 940 μ L의 PE (75mM)와 50mM PBS (pH 7.0)을 넣고 최대한 녹여준 후 100mL 눈금까지 용액을 채운다. 플라스크에 Lactose 30g을 넣고 sonicator로 녹여준다. 완전히 녹인 후 β -Galactosidase 1200unit을 넣고 incubator에서 37°C, 200rpm으로 48h 반응시킨다. 반응의 진행 정도는 TLC로 확인하였다(Fig. 1)

2.3. TLC 분석을 통한 반응물 생합성 확인

20 x 10 cm TLC를 plate에 시료를 loading한 후, 반응물에서 PE-Gal이 생합성 되었는지 확인하였다. 전개용매로는 아세토니트릴 : 증류수 = 97 : 3 (v/v)을 사용하여 10분간 전개하였다. 전개용매의 비율은 당의 전개가 거의 이루어지지 않고, 배당체는 쉽게 전개되는 조건을 찾아 설정하였다. Staining solution (1.5g KMnO₄, 10g K₂CO₃, 1.25 ml 10 % NaOH in 200ml water)를 이용하여 TLC plate를 염색한 후 드라이기를 이용하여 말린 후 밴드를 확인 하였다. TLC 분석에 사용한 시료부피는 기본적으로 1.5 μ l이다.

TLC 결과로 반응이 덜된 starting의 농도가 크다고 판단되는 경우 β -Galactosidase를 추가하여 한번 더 반응 시켰다. 반응 30~48시간 후 생성물 PE-Gal이 최대로 합성됨을 Fig. 2에서 보이는 바와 같이 TLC로 확인하였다.

2.4. 물과 에틸아세테이트를 이용한 분획 및 당침전

반응액 속에 존재하는 PE를 제거하기 위해 물과 에틸아세테이트 용매를 사용하였다. 분별깔때기에 반응액과 에틸아세테이트를 1 : 1를 넣고 섞어준 후 층이 나눌 때까지 기다린다. 에틸아세테이트 층과 물 층을 나눈 후 두 용액을 각각 5 μ l씩 TLC plate에 loading 하였다. TLC 분석결과 에틸아세테이트 층에는 출발물인 PE가 확인되었으며, 반응액 층에는 PE-Gal과 당이 있음을 확인하였다. 남아 있는 galactose는 당침전 방법을 통해 제거 하였다. 분획으로 출발물인 PE를 제거한 반응액에 polarity index를 참고하여 설정한 비율(침전물에 배당체가 남지 않는 조건)인 EtOH와 ACN을 2 : 1 (v/v)을 첨가하고 교반기로 강하게 회전하여 희석한 후 당을 침전시킨다. 침전이 끝난 후 남은 반응액을 다른 등근 플라스크에 옮겨 담은 후, 회전식 감압 농축기(Rotary Evaporator)를 이용하여 농축시킨후, 위의 과정을 반복하여 침전을 반복한다. 그 후 TLC분석을 하여 당이 어느 정도 제거가 되었음을 확인한 후, 칼럼 크로마토그래피를 진행한다.

2.5. 실리카겔 칼럼크로마토그래피

β -Galactosidase를 이용한 PE-Gal 합성한지 30시간 및 48시간 후 TLC로 출발물인 PE-Gal이 생성된 것을 확인하였다. 이후 분액 및 당침전과정을 거쳐 얻어진 혼합물을 실리카겔 칼럼크

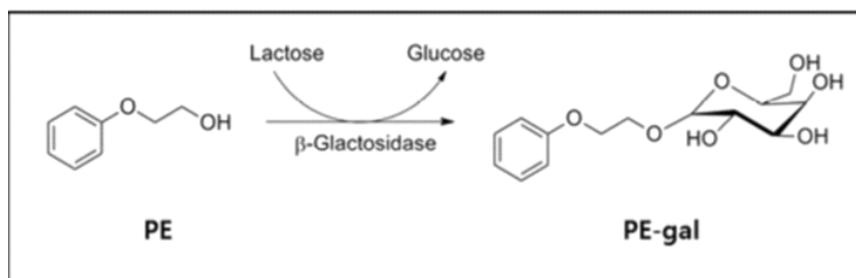


Fig. 1. Enzymatic galactosylation of PE using *E. coli* β -gal.

로마토그래피를 이용하여 분리하였다. 실리카겔 칼럼크로마토그래피에 사용된 전개용매로는 아세토니트릴 : 증류수 = 97 : 3 (v/v)을 사용하였으며 그 결과 생성물 PE-Gal과 과량으로 사용된 lactose을 분리하여 생성물인 PE-Gal을 14.3% 수율로 얻을 수 있었다. 분리한 생성물 A를 TLC로 확인한 결과 Fig. 2에서 보이는 바와 같이 PE-Gal로 나타났다. 그리고 출발물인 PE와 lactose는 TLC 상에 나타나지 않았다.

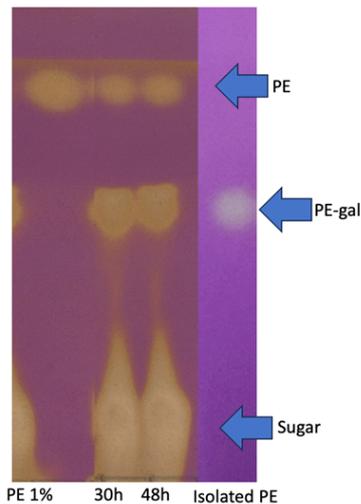


Fig. 2. TLC analyses of bio-synthesized PE-Gal. PE 1%: Starting material, A: Isolated product (PE-Gal) from flash column chromatography.

2.6. HPLC 분석

PE와 PE-Gal의 분석 조건은 용매 A로 3차 증류수를 사용하였고, 용매 B로는 아세토니트릴을 사용하였다. 기울기 용매 조건은 B 0에서 30%로

15분 동안 전개한 후 25분까지 유지를 시켰다. 유속은 1mL/min의 속도로 흘려주었고, column은 Phenomenex Gemini 5 μ m C18 110Å 150 × 4.6mm의 제품을 사용하였다. 컬럼 온도는 30°C로 설정하였고, PDA detector로 280nm의 파장에서 검출되었다. 실험에 쓰인 PE와 PE-Gal의 정량분석을 위해 PE와 PE-Gal 1mg을 PBS : EtOH = 5 : 5(v/v) 용액 1ml에 녹인 것을 Stock으로 하여 2배씩 희석하여, 시료를 준비하였다. 정량분석을 위한 PE와 PE-gal의 표준곡선은 Fig. 3에 나타내었다.

2.7. Franz Diffusion Cell Assay

PE와 PE-Gal의 경피 투과 특성과 피부투과도를 알아보기 위해 Franz Diffusion Cell Assay를 진행하였다. PE와 PE-Gal은 Receptor fluid에 녹여서 실험에 이용하였다. 지용성인 PE와 PE-Gal은 PBS와 EtOH을 1:1 비율로 혼합한 것을 Receptor fluid로 사용하였다. Receptor fluid는 Receptor chamber안에 가득 채워졌으며, PE와 PE-Gal 용액은 Donor chamber에 2mL씩 주입되었다. Cell part에 있는 버튼을 누르면 Magnetic stir bar가 Receptor fluid를 교반하여 PE와 PE-Gal 용액의 확산을 용이하게 하고, 버튼이 눌러진 시점을 실험 시작 시점으로 정한다. 시료 채취 시간은 24시간 내에서 자유롭게 설정이 가능하고, 본 실험에서는 실험 시작 후 1, 2, 4, 6, 8, 12, 20시간 후에 시료채취 하였다. Receptor fluid를 채운 후 sampling port의 용액의 높이를 표시하였다. 시료채취 양은 200 μ L로 하였으며, 시료채취 후 표시한 높이 까지 Receptor fluid를 다시 채워 넣었다. 얻어진 시료는 곧바로 냉장보관 하였으며, 보관을 시작한지 12시간 내에 HPLC를 통해 정량분석 하였다.

Table 2. HPLC analysis method

| | |
|--------------------|--|
| Mobile phase | A : Tertiary distilled water, B : Acetonitrile |
| Flow rate | 1ml/min |
| Injection volume | 100 μ l |
| column | phenomenex Gemini 5 μ m C18 110Å 250x4.6nm |
| Column temperature | 30°C |
| Wave length | 280nm |
| Runtime | 41min |
| Method | Gradient |

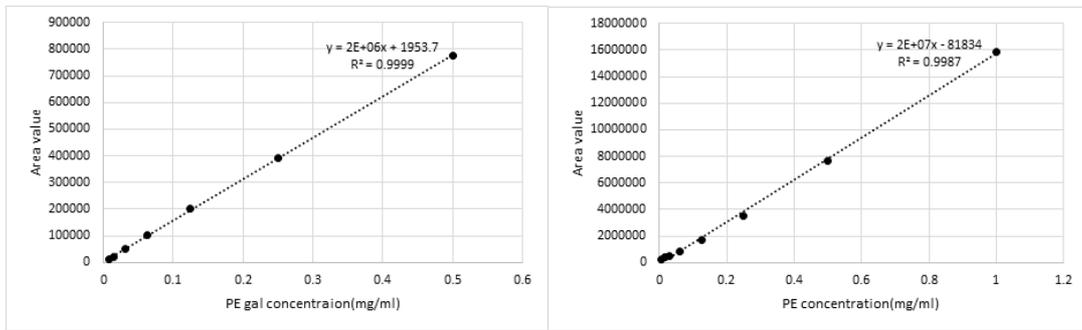


Fig. 3. Calibration curve of PE and PE-Gal.

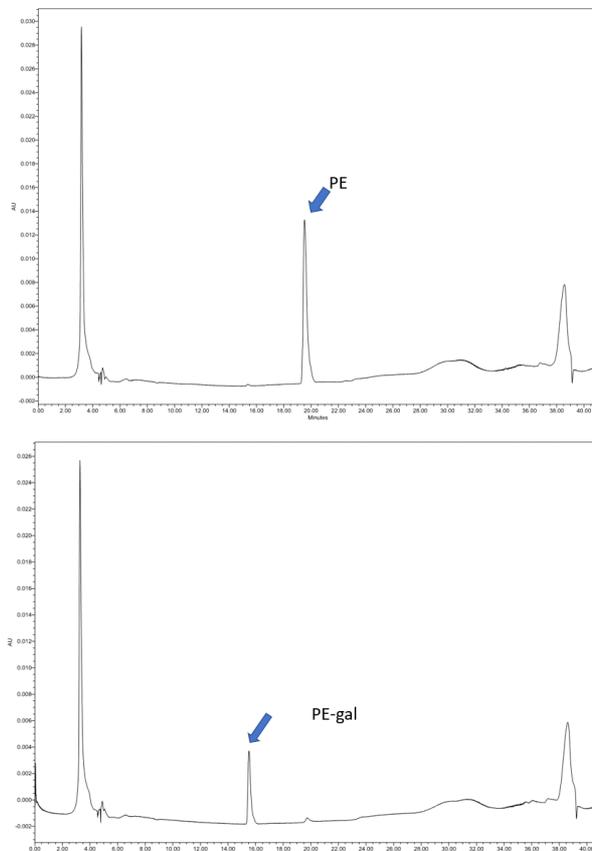


Fig. 4. HPLC chromatogram of the PE and the isolated product, PE-gal.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생합성된 PE-Gal의 HPLC 분석

분획, 당침전 및 silicagel column chromato-

graphy를 거친 생성물의 순도를 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 출발물인 PE가 거의 제거되어 미량의 흔적만이 남아 있었고 생성물인 PE-Gal이 95% 이상

의 순도로 정제된 것을 확인할 수 있었다.

3.2. 경피 투과 시험

경피 투과 시험 결과 당이 없는 PE는 시간이 지남에 따라 인공피부를 투과한 양이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 피부를 통한 화합물의 투과가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 하지만 배당체인 PE-gal은 PE와 동일한 농도 1mg/ml을 사용했음에도 20시간 이후 HPLC에 검출이 될 만큼 충분히 투과를 하지 못하였다. 그 결과는 Fig. 5와 같다.

Flux는 시간당 단위 면적을 통과하는 물질의 양을 나타내는 측정값이다. PE의 Flux 값은 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였으나 생성물인 PE-gal은 flux 값을 측정할 수 있을 만큼 투과를 하지 못하였다. Kp는 물질의 경피 투과능을 나타내는 측정 값으로, Kp는 물질이 경피를 통과하여 체내로 흡수되는 능력을 나타내는 지표로 사용된다. PE의 Kp 값은 시간이 지날수록 증가하였으나 합성물인 PE-gal은 HPLC에서 측정될 만큼 투과하지 못하였다. Marzulli의 정의에 실험 결과를 대입하기 위해 PE의 Kp 값 평균을 구하였다. 그 결과는 Fig. 5와 Table 3에 나타내었다.

Marzulli 등에 따라 Kp 값을 이용하여 투과 정도를 확인하였을 때 PE의 투과속도는 1mg/mL

의 농도에서 느림(slow)으로 나타났다. 같은 조건에서 생성물인 PE-gal은 측정될 만큼 충분히 투과하지 못하여 “매우 느림“보다도 낮은 투과도를 보이는 것으로 추정된다. 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다.

최근 민감성 피부가 증가함에 따라 화장품의 안전성이 매우 중요시 되고 있고 특히 보존제는 부작용을 일으킬 수 있는 주요 자극원의 하나로 알려져 있다. 그러나 보존제의 세포/피부 투과 및 피부자극에 관한 상관성 분석에 관한 연구는 매우 중요함에도 찾아보기 쉽지 않다. 이러한 연구 중 하나로 보존제의 피부투과도를 감소 시 피부 자극이 감소한다는 연구가 알려 있다[14]. 본 연구결과에 의하면 PE로부터 생합성된 PE-gal의 경피투과도는 기존의 보존제인 PE에 비해 상대적으로 매우 낮은 투과도를 가진 것으로 나타나 피부 자극 또한 상대적으로 낮을 것으로 예측된다.

4. 결론

PE와 생합성된 생성물인 PE 배당체 사이의 피부 흡수도 차이를 비교하기 위해 Franz Diffusion Cell Assay 시스템을 이용하여 투과도를 측정하였다. 이번 연구를 통해 같은 질량농도의 샘플을 사용하였을 때 PE의 Flux 값, Kp 값이 시간이 지날수록 증가하는 것으로 나타났다. 이는 PE의

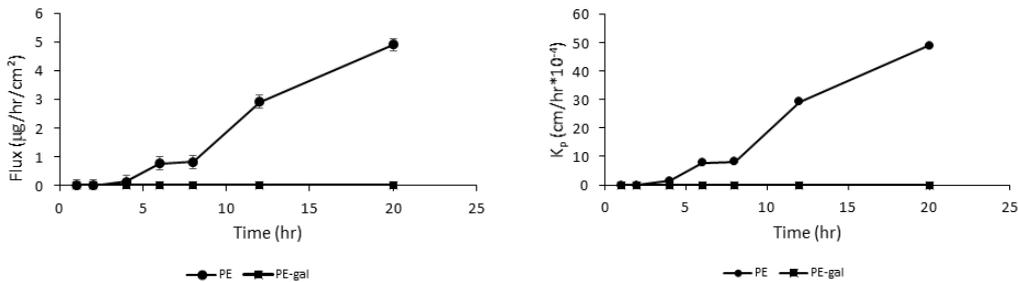


Fig. 5. Flux and Kp of PE and PE-gal. Values are presented as mean ± SD.

Table 3. Average Flux and Kp values of PE and PE-gal

| Group | Flux (µg/hr/cm ²) | PE Kp value Kp(cm/hr*10 ⁻⁴) |
|--------|-------------------------------|---|
| PE | 0.78 ± 0.23 | 7.76 ± 2.3 |
| PE-gal | 0* | 0* |

* PE-gal was not detected by HPLC. Values are presented as mean ± SD.

피부투과도가 생합성된 PE-gal 배당체보다 높다는 것을 나타낸다. 즉 배당체 형태의 PE-gal은 PE에 비해 피부 투과도가 현저히 낮을 수 있음을 암시하고 있다. 현재 PE는 화장품 및 개인용품 산업에서 보존제 또는 살균제로 많이 사용되는 화합물 중 하나로, 세균과 곰팡이의 성장을 억제하여 제품의 유통 기간을 연장하는 데 도움이 된다. 이러한 범용 살균제인 PE에 당을 도입하여 PE 배당체 PE-gal을 생합성함으로써 새로운 보존제 소재를 개발하였다. 이러한 배당체형의 화장품 보존제 소재가 피부투과도를 낮출 수 있다면 화장품 산업에서 안전성 및 규제 요구사항을 충족시키는 데 큰 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다. (2021RIS-001)

References

1. J. Puschmann, M. E. Herbig, C. C. Müller-Goymann, "Correlation of Antimicrobial Effects of Phenoxyethanol with Its Free Concentration in the Water Phase of O/W-Emulsion Gels", *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Vol.131, pp. 152-161, (2018).
2. H.-Y. Lee, K.-H. Jung, "Enzymatic Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside by Whole Cells of Beta-Galactosidase-Containing *Escherichia coli*", *J. Microbiol. Biotechnol.* Vol.24, No.9, pp. 1254-1259, (2014).
3. 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", *J. Kor. Appl. Sci. Tech.*, Vol.33, No.2, pp. 286-292, (2016).
4. H.-Y. Lee, H.-J. Jin, S. H. An, H. W. Lee, K.-H. Jung, "Confirmation of Enzymatic Synthesis of 1, 2-Octanediol Galactoside Using Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy", *J. Kor. Appl. Sci. Tech.*, Vol.38, No.3, pp. 824-831, (2021).
5. H.-Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry of Benzyl Alcohol Galactoside Synthesized Using β -Galactosidase", *J. Kor. Appl. Sci. Tech.*, Vol.36, No.1, pp. 84-89, (2019).
6. H.-Y. Lee, K.-H. Jung, "NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry of Phenylethanol Galactoside Synthesized Using *Escherichia coli* β -Galactosidase", *J. Kor. Appl. Sci. Tech.*, Vol.37, No.5, pp. 1323-1329, (2020).
7. K.-H. Jung, H.-Y. Lee, "*Escherichia coli* Beta-Galactosidase-Catalyzed Synthesis of 2-Phenoxyethanol Galactoside and Its Characterization", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, Vol.38, No.2, pp. 365-372, (2015).
8. P. E. roksch, J. M. Brandner, J. M. Jensen, "The Skin: an Indispensable Barrier", *Exp. Dermatol.*, Vol.17, No.12, pp. 1063-1072, (2008).
9. F. N. Marzulli, D. W. C. Brown, H. I. Maibach, "Techniques for Studying Skin Penetration", *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.14, pp. 76-83, (1969).
10. S. F. Ng, J. J. Rouse, F. D. Sanderson, V. Meidan, G. M. Eccleston, "Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for *In Vitro* Permeation Studies", *AAPS PharmSciTech*, Vol.11, No.3, pp. 1432-1441, (2010).
11. I. Pulsoni, M. Lubda, M. Aiello, A. Fedi, M. Marzagalli, J. von Hagen, S. Scaglione, "Comparison Between Franz Diffusion Cell and a Novel Micro-Physiological System for *In Vitro* Penetration Assay Using Different Skin Models", *SLAS Technol.*, Vol.27, No.3, pp. 161-171, (2022).
12. P. -B. T. Guideline, "OECD Guideline for the Testing of Chemicals", *The Hershberger*, Vol.601, pp. 858, (2001).
13. F. J. Arce, N. Asano, G. L. See, S.

Itakura, H. Todo, K. Sugibayashi, "Usefulness of Artificial Membrane, Strat-M(®), in the Assessment of Drug Permeation from Complex Vehicles in Finite Dose Conditions", *Pharmaceutics*, Vol.12, No.2, pp. 173, (2020).

14. G.-W. Ahn, C.-M. Lee, H.-B. Kim, J.-H. Jeong, B.-K. Jo, "The Studies on the Development of Low Irritable Preservative System with Phenoxyethanol in Cosmetics", *J. Soc. Cosm. Sci. Kor.*, Vol.31, No.1, pp.43-49, (2005).