

주목 식물세포 (*Taxus chinensis*) 배양 유래 타르 성분 동정 및 정량

김건중, 박규연, 김진현*
공주대학교 화학공학부

Received : March 5, 2013 / Revised : May 13, 2013 / Accepted : May 28, 2013

Identification and Quantification of Tar Compounds in Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis*. Kim, Gun-Joong, Gyu-Yeon Park, and Jin-Hyun Kim*. Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Cheonan 330-717, Korea

In this study, the tar compounds derived from the plant cell cultures of *Taxus chinensis* were first identified and then quantified via gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography (GC). 2-Picoline, 2,5-xyleneol, acenaphthene, 1-methylnaphthalene and o-xylene were found to be the major tar compounds by biomass. These compounds were identified and confirmed by comparing their retention times with those of authentic compounds. Each compound also spiked with the pure standard. The contents of 2-picoline, 2,5-xyleneol, acenaphthene, 1-methylnaphthalene, and o-xylene in biomass were 0.2512, 0.1586, 0.1240, 0.0942 and 0.0525 wt%, respectively. Liquid-liquid extraction and adsorbent treatment were able to remove 42% and 94% of the tars from biomass, respectively. After hexane precipitation, all of the tars were perfectly removed.

Keywords: Plant cell culture, *Taxus chinensis*, tar compounds, identification, quantification

서 론

Paclitaxel은 주목나무(yew tree)의 표피에서 발견된 디테르페노이드 계열의 항암물질로 난소암, 유방암, 카포시 종양(Kaposi's sarcoma), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer) 치료용으로 미국 FDA 허가를 취득하여 현재 가장 중요한 항암제로 사용되고 있다[11]. Paclitaxel은 그 독특한 항암기작으로 주목을 받고 있는데 기존의 항암제와는 다른 방식인 유사분열기의 암세포 분열을 억제함으로써 비교적 낮은 독성과 강력한 항암활성으로 1990년대부터 가장 널리 사용되는 항암제이다[22]. 또한, 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등의 적응증이 계속 확대되고 여러 다른 치료방법들과의 복합처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있어서 향후 paclitaxel의 수요는 계속해서 늘어날 전망이다[16]. Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접 추출하는 방법, 반합성 방법, 식물세포배양 방법이 있다. 특히, 식물세포배양 방법은 기후, 환경 등의 외부 인자에 의한 영향

을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다[9].

식물세포배양으로부터 paclitaxel의 분리 및 정제는 여러 단계의 추출 및 정제공정을 거쳐 고순도(>98%)의 제품을 생산하게 된다. 일반적으로 분리 및 정제 과정은 원료인 바이오매스(paclitaxel을 함유한 식물세포)로부터 paclitaxel을 먼저 유기용매로 추출하고, 전 처리 공정(pre-purification process)을 거쳐 최종 정제를 통하여 제품을 생산하는 공정으로 이루어져 있다[14, 20, 21]. 특히 전 처리 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다. 기존에 보고[4, 21]된 공정 중에는 정제를 위한 전 처리 공정으로 고가의 크로마토그래피를 이용하고 있거나 전 처리 없이 추출을 거친 조생성물(crude product)을 high performance liquid chromatography (HPLC)에 의해서 바로 최종 정제하여 경제적 측면에서 많은 문제가 있으며 또한 스케일 업 및 산업적 대량생산에 많은 어려움이 따른다. 대체로 바이오매스로부터 유기용매를 이용하여 paclitaxel을 추출하면 순도는 0.5% 정도이며, 간단한 전 처리 공정 후에도 10% 이하의 순도로 매우 낮다. 이러한 시료를 바로 HPLC에 의해서 최종 정제할 경우 많은 양의 유기용매 사용, 칼럼 충전재(resin)의 수명 단축, 처리량 감소 등 상당히 비경제적이며 대량 생산을 위한 공정으로는

*Corresponding author

Tel: +82-41-521-9361, Fax: +82-41-554-2640
E-mail: jlnhyun@kongju.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

적합하지 않다. 전 처리 공정을 통하여 시료의 순도를 가능하면 높여(>50%) 주어야 최종 정제, 특히 HPLC를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다[13].

기존 문헌에 의하면 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel 정제를 위한 전처리 과정에서 흡착제 처리 공정을 도입하고 있다[7, 10, 15, 17, 20, 23]. 흡착제 처리에 의한 paclitaxel 순도 증가는 미미하나 후속공정에서의 정제 효율(정제 편리성 및 가능성 측면) 향상에 많은 도움이 되기 때문이다. 이러한 이유는 흡착제 처리 공정에 의해 바이오매스 유래 타르 성분이 효율적으로 제거되었기 때문으로 단지 추정만 하였다[15, 20]. 따라서 본 연구에서는 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)와 gas chromatography (GC)를 이용하여 주목 식물세포 *Taxus chinensis* 배양으로부터 회수된 식물세포(바이오매스) 유래 타르 성분을 최초로 동정/정량 하였으며, 또한 paclitaxel 정제를 위한 전처리 과정에서 이들 타르 성분들의 제거 양상을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 그 동안 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel의 정제 과정에서 주요 장애요인이었던 바이오매스 유래 타르 성분을 구체적으로 확인함으로써 향후 정제 공정 개발(맞춤형 타르 성분 제거용 흡착제 및 공정 개발)에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

식물재료와 배양조건

본 연구에 사용된 주목 식물세포배양은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하였다. *Taxus chinensis*로부터 기원된 현탁액 세포는 24°C 암조건에서 150 rpm으로 교반하여 배양하였다. 현탁(suspension) 세포는 수정된 Gamborg's B5 배지[5], 30 g/l sucrose, 10 µm naphthalene acetic acid (NAA), 0.2 µm 6-benzylaminopurine (BA), 1 g/l casein hydrolysate, 1 g/l 2-[N-morpholino]ethansulfonic acid (MES)에서 배양하였다. 세포 배양은 2주마다 새로운 배지로 갈아주었으며 생산과 배양을 연장시키기 위해 7일과 21일 째 되는 날에 1~2%의 maltose를 첨가해 주고 elicitor로서 배양 초기에 4 µm의 AgNO₃를 첨가해 주었다[3]. 식물세포배양 후 배양액으로부터 decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)와 고속 원심분리기(α-Laval, BTPX205GD-35CDEEP)를 이용하여 식물세포와 세포조각(cell debris)을 회수하였다. 식물세포와 세포조각을 합하여 바이오매스라 하였으며 (주)삼양제믹스에서 제공 받았다.

타르 성분 동정 및 정량 분석을 위한 시료 준비

본 연구에서는 타르 성분 동정 및 정량 분석을 위하여,

paclitaxel 정제를 위한 각 전처리 공정별 시료(시료 I, 시료 II, 시료 III, 시료 IV)를 준비하였다. 시료 I: 식물세포배양액으로부터 회수한 바이오매스와 메탄올의 비율을 1:1 (w/v)로 하여 실온에서 4회 반복 추출하고 추출액을 rotary evaporator (CCA-1100, EYELA, Japan)를 이용하여 농축하여 진공오븐(UP-2000, EYELA, Japan)으로 진공건조 하였다. 시료 II: 메탄올 추출 후 건조된 시료를 이용하여 액-액 추출을 3회 반복 수행하였다. 시료를 메탄올에 녹이고 메틸렌 클로라이드를 첨가(메탄올/메틸렌 클로라이드 = 4:1, v/v)하고, 30 분 동안 교반 후 정제시켰다[12]. 액-액 추출 후 상분리를 통해 극성 불순물은 상층인 메탄올 층으로 제거하고, paclitaxel은 하층인 메틸렌 클로라이드 층으로 회수하여 농축/진공건조 하였다. 시료 III: 시료 II를 메틸렌 클로라이드에 20% (w/v) 비율로 녹이고 흡착제인 sylopute (Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan)를 건조된 조추출물(crude extract) 대비 50% (w/w) 비율로 첨가하여 40°C 항온조(PS-1000, EYELA, Japan)에서 30분 동안 교반 하며 반응시킨 후 여과지(150 mm, Whatman)로 감압 여과하였다. 여과액은 30°C에서 진공건조 하였다. 시료 IV: 흡착제 처리 후 여과된 여과액을 건조하여 헥산 침전 공정에 이용하였다. 건조된 시료를 메틸렌 클로라이드에 녹여 헥산에 떨어뜨려 침전을 유도하여 비극성 불순물을 제거하였다(메틸렌 클로라이드/헥산 = 1:10, v/v). 헥산 침전 후 여과를 통하여 paclitaxel 침전물을 얻고 35°C에서 24시간 동안 진공건조 하였다. 시료 I-IV는 바이오매스 유래 타르 성분의 동정/정량 분석에 사용하였다. 바이오매스 유래 타르 성분의 동정과 정량 분석을 위한 시료 준비 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

타르 성분 동정

바이오매스 유래 타르 성분의 동정을 위하여 시료 I을 메틸렌 클로라이드에 녹여 1000 ppm(w/v) 용액을 제조하였다. 정성 분석에 의한 미지 물질(unknown material)의 동정에 많이 사용되는 GC/MS (6890N, Agilent, USA) 분석을 통하여 제조된 용액으로부터 바이오매스 유래 미지의 타르 성분을 동정하였다. 분석 조건은 HP-5MS 칼럼(0.25 µm film, 0.25 mm ID × 30 m, Agilent)을 통해 분석하였으며, 칼럼 내에서의 분리 온도는 50°C에서 250°C까지 5°C/min의 속도로 프로그래밍하여 사용하였다. 사용 가스는 헬륨이며 1.0 ml/min 유속으로 분석하였다. *Taxus chinensis* 유래 타르 성분의 동정을 위하여, 일반적으로 바이오매스 유래 타르로 알려져 있는 46종의 대표적 타르 성분을 동일 조건하에서 GC/MS 분석을 수행하여 크로마토그램 상의 체류시간(retention time)을 비교/분석하였다. 또한 표준물질(타르 성분)을 이용한 spike testing을 통하여 동일 물질임을 확인하였다[1, 18].

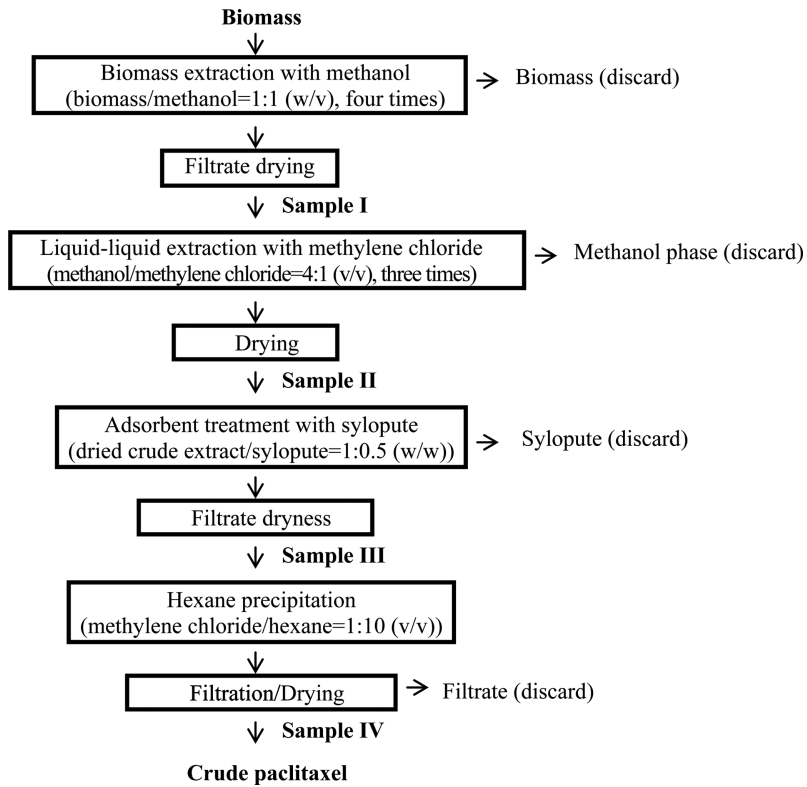


Fig. 1. Preparation of sample for the identification and quantification of tar compounds from biomass.

타르 성분 정량 분석

타르 성분의 정량 분석을 위해서 준비된 시료(시료 I~IV)를 각각 메탄올을 용매로 1000 ppm(w/v) 용액을 제조하였다. 제조된 용액은 GC (GC-2014, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 HP-5 칼럼(25 m, 0.33 µm film, 0.20 mm ID, HP) 및 FID (flame ionization detector)를 통해 분석하였으며, 칼럼 내에서의 분리 온도는 50°C에서 250°C까지 5°C/min의 속도로 프로그래밍하여 사용하였다. 사용 가스는 헬륨이며 1.0 ml/min 유속으로 분석하였다. GC/MS 분석을 통하여 동정된 바이오매스 유래 타르 성분에 대해 GC 분석에 의한 표준곡선을 작성하여 시료 1 g 당 타르의 양을 측정하였다. 시료와 각 타르 성분의 주입량은 동일하게 0.2 µl로 하였다. 시료 1 g에서의 타르 성분이 차지하는 비율로 계산하여 중량퍼센트(wt%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

타르 성분 동정 및 확인

바이오매스 유래 타르 성분을 동정하기 위하여 시료I을 이용하여 GC/MS 분석을 수행하였다. GC/MS 크로마토그램 상으로 5종류의 주요 피크를 확인하였다(Fig. 2). GC/MS 크로

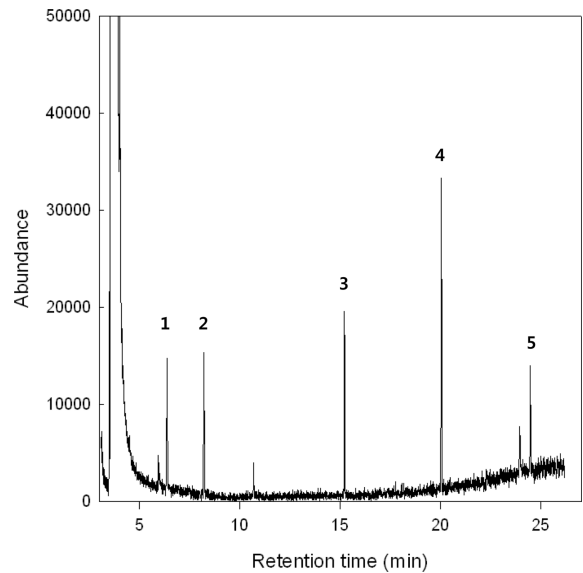


Fig. 2. Chromatogram of Sample II via GC/MS.

마토그램 상으로 5종류의 피크를 동정하기 위하여, 문헌[2, 6]에 보고된 46종의 대표적 바이오매스 유래 타르 성분을 이용하여 체류시간을 비교/분석하였다. GC/MS 크로마토그램

Table 1. Identification of tar compounds from biomass.

Compound	Retention time (min)	Identified tar compounds
1	6.374	2-Picoline
2	8.208	o-Xylene
3	15.209	2,5-Xylenol
4	20.045	1-Methylnaphthalene
5	24.474	Acenaphthene

상으로 체류시간 6.374, 8.208, 15.209, 20.045, 24.474분에 검출되는 물질이 각각 2-picoline, o-xylene, 2,5-xylenol, 1-methylnaphthalene, acenaphthene과 동일함을 확인하였다. 또한 이들 5종의 타르 성분에 대해 표준물질을 시료에 각각 1000 ppm을 첨가하여 spike testing을 수행하여 동일 물질임을 재확인하였다(Table 1).

타르 성분의 정량 분석

타르 성분의 정량은 시료 I~IV를 1000 ppm 농도로 메탄올에 녹인 용액을 제조하여 확인하였다. 식물세포(*Taxus chinensis*) 배양액으로부터 회수한 바이오매스(식물세포)로부터 항암물질 paclitaxel 정제를 위한 대표적 전처리 공정은 바이오매스 추출(메탄올 추출), 액-액 추출, 흡착제 처리 및 핵산 침전 공정으로 구성되어 있다[20]. 따라서 본 연구에서는 이들 전처리 과정을 통한 바이오매스 유래 타르 성분의 제거 양상을 확인하고자 하였다.

메탄올 추출: 메탄올 추출물의 정량 분석은 메탄올을 이용하여 4회의 추출을 수행한 시료 I을 이용하여 분석하였다. 메탄올로 추출된 시료 내의 타르 성분의 양은 건조 바이오매스 기준으로 중량퍼센터로 계산하였다. GC 분석 결과, 메탄올 추출물 내에는 건조 바이오매스 기준으로 총 0.6805 wt% (2-picoline: 0.2512 wt%, 2,5-xylenol: 0.1586 wt%, acenaphthene: 0.1240 wt%, 1-methylnaphthalene: 0.0942 wt%, o-xylene: 0.0525 wt%)의 타르 성분이 포함되어 있음을 확인하였다.

액-액 추출: 액-액 추출을 수행한 시료를 건조한 시료 II를 분석한 결과, 전체적으로 타르 성분의 중량퍼센터가 감소하였다. 액-액 추출을 수행한 시료의 타르 성분은 총 0.3973 wt% (2-picoline: 0.1765 wt%, 2,5-xylenol: 0.1016 wt%, acenaphthene: 0.0497 wt%, 1-methylnaphthalene: 0.0227 wt%, o-xylene: 0.0468 wt%)의 타르 성분이 포함된 것으로 확인되었다. 액-액 추출을 수행한 결과, 메탄올 추출한 시료 내 총 타르 성분의 양 대비 42%의 타르 성분이 제거됨을 확인할 수 있었다. 1-Methylnaphthalene, acenaphthene, 2,5-xylenol, 2-picoline의 경우에는 각각 75.90, 59.92, 35.94, 29.74%로 높은 제거율을 보인 반면 o-xylene의 경우에는

10.86%의 제거율로 상대적으로 적게 제거됨을 알 수 있었다. o-Xylene의 경우 수용액에 대한 용해도가 낮아 액-액 추출 과정에서 수용액(물/메탄올) 층에 녹지 못하고 메틸렌 클로라이드 층에 잔존하는 것으로 판단된다. 이러한 이유로 액-액 추출 과정에서의 상 분리에서 상층인 물/메탄올 층으로 제거되는 것보다 하층인 메틸렌 클로라이드 층에 잔류하는 것이 더 많아져 o-xylene 제거율이 상대적으로 낮은 것으로 판단된다.

흡착제 처리: 액-액 추출을 수행한 시료를 40°C에서 30분 동안 sylopute를 이용해서 흡착제 처리를 수행하여 얻은 시료 III을 분석한 결과, 2-picoline과 o-xylene의 양도 상당히 줄었지만 이들 2종류의 타르 성분을 제외한 나머지 세 종류의 타르 성분(2,5-xylenol, 1-methylnaphthalene, acenaphthene)은 완전히 제거됨을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 paclitaxel 정제를 위한 전처리 과정에서 흡착제 처리가 바이오매스 유래 타르 성분 제거에 상당히 효과적인 공정임을 확인할 수 있었다. 흡착제 처리 이후 타르 성분은 총 0.0433 wt% (2-picoline: 0.03379 wt%, o-xylene: 0.00951 wt%)로 메탄올 추출물에 포함되어 있는 타르 성분의 총량 대비 94% 정도 제거되었다. 이러한 결과는 기존 문헌[15, 20]에서 보고한 바와 같이 식물세포배양액으로부터 항암물질 paclitaxel 정제 과정에서 바이오매스 유래 타르/왁스 성분 제거를 위하여 흡착제 처리 공정을 도입한 결과와도 잘 일치함을 알 수 있었다. 흡착제 처리 공정을 통하여 paclitaxel의 순도 증가는 미미하나 정제 과정에서 많은 악영향을 미치는 바이오매스 유래 타르 성분을 효과적으로 제거함으로써 후속 공정의 효율성, 편리성, 가능성을 향상시킬 수 있었다.

핵산 침전: 흡착제 처리 공정에서 제거되지 않은 두 종류의 타르 성분(2-picoline, o-xylene)이 후속 공정에서의 제거 여부를 확인하기 위하여 핵산 침전을 수행하였다. 흡착제 처

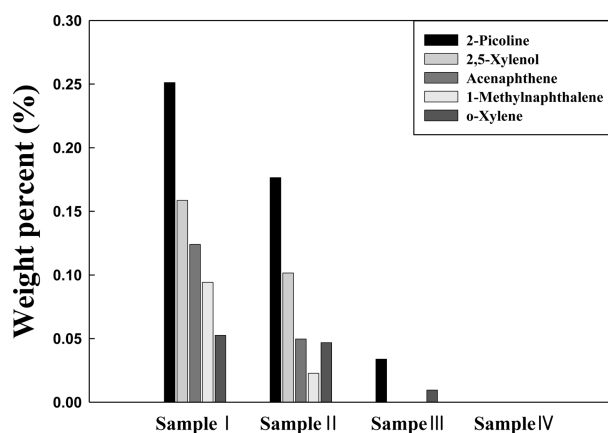


Fig. 3. Change in amounts of tar compounds through the stages of paclitaxel pre-purification from plant cell cultures of *Taxus chinensis*.

Table 2. Quantification of tar compounds in the pre-purification process of paclitaxel from plant cell cultures of *Taxus chinensis*.

	Compound (wt%)				
	2-Picoline	2,5-Xylenol	Acenaphthene	1-Methylnaphthalene	o-Xylene
Sample I	0.2512	0.1586	0.1240	0.0942	0.0525
Sample II	0.1765	0.1016	0.0497	0.0227	0.0468
Sample III	0.0338	-	-	-	0.0095
Sample IV	-	-	-	-	-

리 후 건조된 시료를 메틸렌 클로라이드에 녹인 후 헥산에 떨어뜨려(메틸렌 클로라이드/헥산 = 1:10, v/v) 침전을 유도하였다. 비극성불순물은 상등액(헥산)으로 제거되고 침전물만 회수/건조하여 시료 IV를 제조하였다. 헥산 침전이 완료된 시료를 GC를 이용하여 분석한 결과, 바이오매스 유래 모든 타르 성분이 완전히 제거됨을 확인하였다. 또한 헥산 침전 후 시료를 이용하여 GC/MS 정성분석을 수행한 결과, 모든 주요 타르 성분의 피크가 완전히 제거되었음을 확인하였다. 헥산은 비극성 용매로 헥산 침전 공정에서 비극성 성분(2-picoline, o-xylene)은 극성도에 의해 침전물이 아닌 상등액으로 효과적으로 제거된다[24]. 바이오매스 유래 타르 성분이 항암물질 paclitaxel 정제를 위한 전처리 과정에서 제거되는 정도를 Fig. 3과 Table 2에 각각 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)와 gas chromatography (GC)를 이용하여 주목 식물세포 *Taxus chinensis* 유래 타르 성분을 최초로 동정/정량하였다. 또한 식물세포배양으로부터 항암물질 paclitaxel 정제를 위한 전처리 과정에서 이들 타르 성분들의 제거 양상을 확인하였다. GC/MS 분석을 통하여 체류시간을 비교한 결과, 5종류의 타르성분이 체류시간 6.374, 8.208, 15.209, 20.045, 24.474분에서 각각 2-picoline, o-xylene, 2,5-xylenol, 1-methylnaphthalene, acenaphthene이 동정되었다. 또한 표준물질을 이용한 spike testing을 수행한 결과 동일 물질임을 재확인 하였다. GC 분석을 통하여 동정된 5종류 타르 성분을 정량한 결과, 메탄올 추출물에 총 0.6805 wt% (2-picoline: 0.2512 wt%, 2,5-xylenol: 0.1586 wt%, acenaphthene: 0.1240 wt%, 1-methylnaphthalene: 0.0942 wt%, o-xylene: 0.0525 wt%) 타르 성분이 존재하였다. 액-액 추출을 수행한 결과, 메탄올 추출물 시료 내 총 타르 성분의 양 대비 42%의 타르 성분이 제거됨을 확인할 수 있었다. 1-Methylnaphthalene, acenaphthene, 2,5-xylenol, 2-picoline의 경우에는 각각 75.90, 59.92, 35.94, 29.74%로 높은 제거율을 보인 반면 o-xylene의 경우에는 10.86%의 제거율로 상대적으로 적게 제거됨을 알 수 있었다. 흡착제 처리 후 2-picoline과 o-xylene

의 양도 상당히 줄었지만 이들 2 종류의 타르 성분을 제외한 나머지 세 종류의 타르 성분(2,5-xylenol, 1-methylnaphthalene, acenaphthene)은 완전히 제거됨을 확인할 수 있었다. 흡착제 처리 공정에서 제거되지 않은 두 종류의 타르 성분(2-picoline, o-xylene)은 헥산 침전 공정에 의해 완전히 제거 가능하였다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korean Government (MEST) (No. 2011-0010907).

References

1. Brage C, Sjoström K. 1991. Separation of phenols and aromatic hydrocarbons from biomass tar using aminopropylsilane normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **2**: 303-310.
2. Carpenter DL, Deutch SP, French RJ. 2007. Quantitative measurement of biomass gasifier tars using a molecular-beam mass spectrometer: Comparison with traditional impinger sampling. *Energy & Fuels.* **21**: 3036-3043.
3. Choi HK, Adams TL, Stahlhut RW, Kim SI, Yun JH, Song BK, et al. 1999. Method for mass production of taxol by semi-continuous culture with *Taxus chinensis* cell culture. U.S. Patent 5,871,979.
4. ElSohly HN, Jr. Croom EM, ElSohly MA, McChesney JD. 1997. Methods and compositions for isolating taxanes. 1997. U.S. Patent 5,618,538.
5. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
6. Han J, Kim HJ. 2008. The reduction and control technology of tar during biomass gasification/pyrolysis: An overview. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **12**: 397-416.
7. Han MK, Jeon KY, Mun S, Kim JH. 2010. Development of a micelle-fractional precipitation hybrid process for the pre-purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochem.* **45**: 1368-1374.
8. Hata H, Saeki S, Kimura T, Sugahara Y, Kuroda K. 1999. Adsorption of taxol into ordered mesoporous silicas with vari-

- ous pore diameters. *Chem. Mater.* **11**: 1110-1119.
9. Jeon KY, Kim JH. 2008. Effect of surfactant on the micelle process for the pre-purification of paclitaxel. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 557-560.
 10. Jeon KY, Kim JH. 2009. Improvement of fractional precipitation process for pre-purification of paclitaxel. *Process Biochem.* **44**: 736-741.
 11. Kim JH. 2006. Paclitaxel : recovery and purification in commercialization step. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**: 1-10.
 12. Kim JH. 2009. Optimization of liquid-liquid extraction conditions for paclitaxel separation from plant cell cultures. *KSBB J.* **24**: 212-215.
 13. Kim JH, Kang IS, Choi HK, Hong SS, Lee HS. 2000. Fractional precipitation for paclitaxel pre-purification from plant cell cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnol. Lett.* **22**: 1753-1756.
 14. Kim JH, Kang IS, Choi HK, Hong SS, Lee HS. 2002. A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochem.* **37**: 679-682.
 15. Lee JY, Kim JH. 2011. Development and optimization of a novel simultaneous microwave-assisted extraction and adsorbent treatment process for separation and recovery of paclitaxel from plant cell cultures. *Sep. Puri. Technol.* **80**: 240-245.
 16. McGuire WP, Rowinsky EK, Resenshein NB, Grumbine FC, Ettinger DS, Armstrong DK, *et al.* 1989. Taxol : a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann. Intern. Med.* **111**: 273-279.
 17. Oh HJ, Jang HR, Jung KY, Kim JH. 2012. Evaluation of adsorbents for separation and purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Process Biochem.* **47**: 331-334.
 18. Park YJ, Sirny RJ. 1969. Gas-liquid chromatographic determination of amino acids in some Korean foods. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **12**: 43-51.
 19. Pyo SH, Song BK, Ju CH, Han BH, Choi HJ. 2005. Effects of adsorbent treatment on the purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* and yew tree. *Process Biochem.* **40**: 1113-1117.
 20. Pyo SH, Park HB, Song BK, Han BH, Kim JH. 2004. A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochem.* **39**: 1985-1991.
 21. Rao KV. 1997. Method for the isolation and purification of taxol and its natural analogues. U.S. Patent 5,750,709.
 22. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. 1990. Taxol : a novel investigational antimicrotubule agent. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1247-1259.
 23. Sim HA, Lee JY, Kim JH. 2012. Evaluation of a high surface area acetone/ pentane precipitation process for the purification of paclitaxel from plant cell cultures. *Sep. Puri. Technol.* **89**: 112-116.
 24. Uruska I, Koschmidder M. 1987. A calorimetric study of complex formation between molecular iodine and pyridine or 2-methylpyridine in weakly polar solvents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **12**: 1713-1715.