

식물세포배양으로부터 파클리탁셀 회수를 위한 무기염이 첨가된 액-액 추출

하건수 · 김진현[†]

공주대학교 화학공학부
31080 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24
(2015년 7월 16일 접수, 2015년 8월 12일 수정본 접수, 2015년 9월 8일 채택)

Liquid-Liquid Extraction for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Cultures by Adding Inorganic Salts

Geon-Soo Ha and Jin-Hyun Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, 1223-24, Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam, 31080, Korea
(Received 16 July 2015; Received in revised form 12 August 2015; accepted 8 September 2015)

요 약

본 연구에서는 무기염을 첨가한 액-액 추출에 의해 식물세포인 바이오매스로부터 파클리탁셀 회수 방법을 획기적으로 개선하고자 하였다. 다양한 무기염(NaCl, KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄·2H₂O)을 이용하여 추출효율을 조사한 결과, NaCl에서 가장 낮은 분배계수(0.053)로 가장 높은 파클리탁셀 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. NaCl을 이용한 액-액 추출에서 최적의 NaCl/용매 비와 메틸렌 클로라이드/메탄올 비는 각각 1%(w/v)와 26%(v/v)이었다. 또한 최적의 NaCl/용매 비와 메틸렌 클로라이드/메탄올 비에서 파클리탁셀 함량에 따른 영향을 조사한 결과, 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)에서 가장 낮은 분배계수(0.053)로 가장 높은 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. 기존 액-액 추출의 경우 총 3회의 추출로 파클리탁셀을 95% 정도 회수 가능한 반면 무기염을 이용한 방법의 경우 단 1회 추출로 대부분의 파클리탁셀을 회수(~96%) 가능하였다.

Abstract – We developed a liquid-liquid extraction method using an inorganic salt to dramatically improve the recovery efficiency of the anticancer agent paclitaxel from plant cell cultures. As a result of liquid-liquid extraction using a diverse types of inorganic salt (NaCl, KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄·2H₂O), NaCl gave the highest yield (~96%) and lowest partition coefficient (0.053) of paclitaxel. The optimal NaCl/solvent ratio, methylene chloride/MeOH ratio, and pure paclitaxel content for liquid-liquid extraction using NaCl were 1% (w/v), 26% (v/v), and 0.066% (w/v), respectively. Under the optimal conditions developed in the present method, most of the paclitaxel (~96%) was recovered from biomass by a single extraction step. In addition, this method facilitated 3-fold higher recovery efficiency of paclitaxel in a shorter extraction number than the conventional liquid-liquid extraction method.

Key words: Paclitaxel, Recovery, Liquid-Liquid Extraction, Inorganic Salt, NaCl

1. 서 론

파클리탁셀(paclitaxel)은 주목나무(yew tree)의 껍질에서 발견된 디테르페노이드(diterpenoid) 계열의 항암물질이다. 난소암, 유방암, 두경부암(head and neck cancer), 카포시종양(kaposi's sarcoma), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 치료에 효과적이며 현재 가장 많이 사용되고 있는 항암제이다[1]. 또한, 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등의 적응증이 계속 확대되고 여러 다른

치료 방법들과의 복합처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있어 향후 파클리탁셀 수율은 계속 늘어날 전망이다[2,3]. 파클리탁셀의 주요 생산 방법으로는 주목나무에서 직접추출(extraction)하는 방법, 주목나무의 잎에서 전구체(baccatin III, 13-dehydroxybaccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetyl paclitaxel 등)를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성(semi-synthesis) 방법, 주목나무에서 callus를 유도하고 종균배양(seed culture)을 거쳐 주배양기(main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법이 있다[4-6]. 이들 중 식물세포 배양 방법은 기후, 환경 등의 외부인자에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 파클리탁셀을 대량 생산할 수 있다[5,7]. 식물세포배양에 의하여 생산된 파클리탁셀은 대부분 식물세포와 세포조각(debris)에 포함되어 있으며[8], 식물세포배양으로부터 항암물질과

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

클리탁셀의 생산은 여러 단계의 추출 및 정제 공정으로 이루어져 있다[9-11]. 먼저 세포 내에 포함되어 있는 파클리탁셀을 높은 수율로 분리/회수하는 것이 경제적인 관점에서 매우 중요하다. 기존 문헌 [12,13]에 의하면, 분리/회수 공정은 먼저 유기용매(주로 메탄올)를 이용한 바이오매스 추출 후 추출액에 존재하는 다량의 극성 불순물(polar impurity)을 액-액 추출(liquid-liquid extraction)에 의해 제거하는 것이 일반적이다. 또한 여러 가지 유기용매(메틸렌 클로라이드, 클로로포름, 디에틸에테르, 헥산/메틸렌 클로라이드 등)를 이용하여 액-액 추출 경향을 조사한 결과, 메틸렌 클로라이드의 경우 높은 극성불순물 제거 효과뿐만 아니라 높은 파클리탁셀 순도와 수율을 얻어 액-액 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다[14]. 하지만 액-액 추출 공정에서의 주요 공정변수인 유기용매 첨가량, 추출횟수, 혼합시간, 상 분리에 소요되는 정제시간 등에 대한 정보는 매우 미흡한 실정이다. 2009년에 개선된 액-액 추출 공정에서 주요 공정변수를 최적화하여 높은 순도와 수율의 파클리탁셀을 얻을 수 있었다[15]. 하지만 기존의 액-액 추출 방법에 의해 높은 파클리탁셀 회수(>95%)를 위하여 3회 이상의 추출 과정이 요구되어 많은 유기용매 사용뿐만 아니라 액-액 추출에 많은 시간이 소요되었다. 따라서 산업적 대량 생산을 위해 추출횟수를 획기적으로 단축할 수 있는 고효율 액-액 추출공정 개발이 여전히 필요한 실정이다.

무기염을 이용한 액-액 추출공정은 목적 성분의 추출효율을 향상시킬 수 있다는 점에서 매우 효과적인 방법으로 보고되고 있다[16-19]. 이러한 무기염을 이용한 방법은 공정이 단순하며 기존의 추출 방법에 비하여 추출효율 향상, 조업시간 단축, 그리고 에너지 절감 등 다양한 효과를 기대할 수 있다[19]. 따라서 본 연구에서는 무기염을 접목한 액-액 추출에 의해 파클리탁셀 회수 방법을 획기적으로 개선하고자 하였다. 또한 무기염을 이용하여 파클리탁셀을 효율적으로 회수할 수 있는 최적의 액-액 추출조건인 NaCl/용매(메탄올+메틸렌 클로라이드) 비, 메틸렌 클로라이드/메탄올 비, 순수 파클리탁셀 함량을 선정하여 궁극적으로 단 1회의 액-액 추출로 대부분(~96%)의 파클리탁셀을 회수하고자 하였다. 이러한 연구결과는 식물세포배양으로부터 항암물질 파클리탁셀을 효율적으로 회수하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

2. 재료 및 방법

2-1. 식물재료 및 배양조건

본 실험에 사용된 식물세포배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하여 배양하였다. *Taxus chinensis*로부터 기원된 현탁액 세포는 24 °C 암조건(darkness condition)에서 150 rpm으로 교반하여 배양하였다. 현탁(suspension) 세포는 수정된 Gamborg's B5 배지, 30 g/L sucrose, 10 mM naphthalene acetic acid, 0.2 μM 6-benzylaminopurine, 1 g/L casein hydrolysate, 1 g/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid에서 배양하였다. 세포 배양은 2 주마다 새로운 배지(media)로 갈아주었고, 배양 시간을 연장시키기 위해 7일과 21일째 되는 날에 1~2%(w/v)의 maltose를 첨가해 주고 elicitor로서 배양 초기에 4 mM의 AgNO₃를 첨가해 주었다[7,20]. 식물세포배양 후 배양액으로부터 decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)와 고속원심 분리기(α-Laval, BTPX205GD-35CDEEP)를 이용하여 식물세포와 세포조각(cell debris)을 회수하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 바이오매스라 하였다. 본 연구에 사용

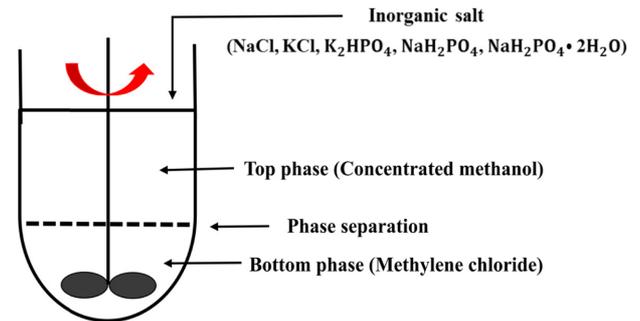


Fig. 1. Schematic diagram of the liquid-liquid extraction process with inorganic salt.

된 바이오매스는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

2-2. 바이오매스 추출 및 액-액 추출

식물세포배양액으로부터 회수한 바이오매스와 메탄올의 비율을 1:1(w/v)로 하여 상온(room temperature)에서 30분 동안 교반 하에서 4회 반복 추출하였다[14]. 추출 후 여과지(150 mm, Whatman)로 감압 여과하여 파클리탁셀 추출 여액을 회수하고 농축기(CCA-1100, EYELA, Japan)를 이용하여 농축(원액의 30%)하였다. 메탄올 농축액에 메틸렌 클로라이드와 다섯 종류의 무기염(NaCl, KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄·2H₂O)를 첨가하여 무기염 농도 1%(w/v)으로 조절한 후 상온에서 혼합 후 30분 동안 정제시켜 상 분리(상층: 메탄올 농축액 층, 하층: 메틸렌 클로라이드 층)를 유도하였다. 액-액 추출에서의 주요 공정변수(NaCl/용매 비, 메틸렌 클로라이드/메탄올 비, 순수 파클리탁셀 함량)를 각각 최적화 하였다. 액-액 추출 후 상 분리로부터 파클리탁셀을 함유하고 있는 하층인 메틸렌 클로라이드 층을 회수하여 농축기를 이용하여 농축하고 진공건조(40 °C, overnight, 760 mmHg)하여 HPLC 분석을 통하여 파클리탁셀 순도와 수율을 계산하였다. 무기염 첨가에 의한 액-액 추출 공정을 Fig. 1에 나타내었다. 또한 액-액 추출에서 파클리탁셀 수율과 분배계수는 각각 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Yield}(\%) = [\text{amount of paclitaxel in bottom phase} / \text{amount of paclitaxel in feed}] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Partition coefficient} (K_p) = \frac{\text{Concentration of paclitaxel in top phase}}{\text{Concentration of paclitaxel in bottom phase}} \quad (2)$$

2-3. 파클리탁셀 분석

파클리탁셀 함량 분석을 위해 HPLC 시스템(Waters, USA)과 Capell Pak C₁₈ (250×4.6 mm, Shiseido, Japan) 칼럼을 사용하였다. 이동상은 증류수와 아세트니트릴 혼합용액(65/35~35/65, v/v, 구배용매조성법)을 유속 1.0 ml/min으로 흘려주었다. 시료 주입량은 20 μl이며 227 nm에서 UV에 의해 검출하였다[9,13]. HPLC 분석은 표준 정량곡선을 이용하였으며 표준시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: >97%)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 무기염 첨가에 따른 영향

식물세포 배양에 의하여 생산된 파클리탁셀은 대부분 바이오매스에

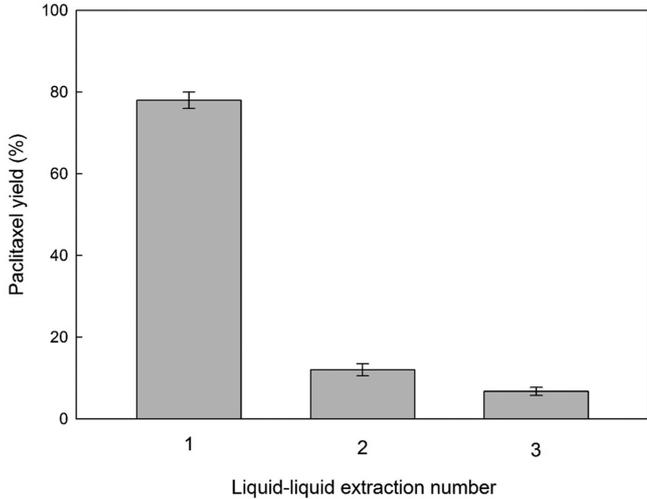


Fig. 2. Effect of liquid-liquid extraction number on the yield of paclitaxel using conventional liquid-liquid extraction method. The methylene chloride/MeOH ratio and pure paclitaxel content were 25% (v/v) and 0.066% (w/v), respectively.

포함되어 있으며[8], 파클리탁셀의 생산을 위해서는 먼저 유기용매를 이용한 바이오매스 추출이 이루어진다. 유기용매(메탄올)를 이용한 바이오매스 추출물에는 다량의 극성 불순물이 포함되어 있는데 메틸렌 클로라이드를 이용한 액-액 추출에 의해 이러한 극성불순물을 매우 효과적으로 제거할 수 있다[15]. 무기염을 첨가하지 않은 기존의 액-액 추출은 1회 추출 시 77%, 2회 추출 시 12%, 3회 추출 시 6% 파클리탁셀이 각각 회수되어 총 3회의 추출로 대부분의 파클리탁셀 회수(~95%)가 가능하였다(Fig. 2). 액-액 추출 공정에서 파클리탁셀의 추출 효율을 극대화 하기 위하여, 기존에 여러 가지 유용물질의 회수를 위한 액-액 추출공정에 많이 사용되고 있는 무기물(NaCl, KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄·2H₂O)을 각각 첨가하여 액-액 추출을 1회 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 모든 무기염(NaCl, KCl, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄·2H₂O)에서 무기염을 첨가하지 않은 control (수율: 77%, 분배계수: 0.282)보다 높은 수율과 낮은 분배계수를 얻었다. 특히 NaCl에서 가장 낮은 분배계수(0.053)로 가장 높은 파클리탁셀 수율(~96%)을 하층(메틸렌 클로라이드 층)으

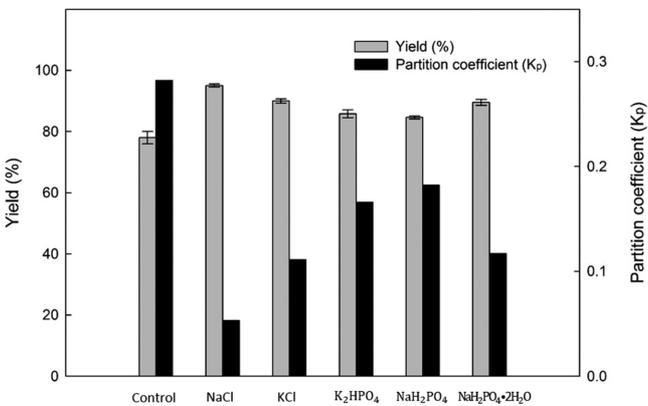


Fig. 3. Effect of inorganic salt on the extraction yield and partition coefficient of paclitaxel. The methylene chloride/MeOH ratio, pure paclitaxel content, and salt concentration of top phase for liquid-liquid extraction were 26% (v/v), 0.066% (w/v), 1% (w/v), respectively.

로부터 얻을 수 있어 파클리탁셀 회수를 위한 액-액 추출에서 최적의 무기염임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 무기염 첨가에 따른 salting-out 효과로 상층(메탄올 농축액)에 존재하는 파클리탁셀이 하층(메틸렌 클로라이드 층)으로 효과적으로 이동하였기 때문으로 판단된다[16-18]. 특히 NaCl에서 가장 효과적인 이유는 상층에 적절한 점도 제공에 의한 효과적인 물질전달 때문으로 판단된다[21]. 무기염 첨가 유무에 관계 없이 액-액 추출에서 얻은 파클리탁셀 순도(>16%)는 거의 차이가 없음을 알 수 있었다(data not shown). 결과적으로 액-액 추출에서 무기염 NaCl을 사용하였을 때 1회 추출로 가장 높은 수율(~96%)을 얻어 파클리탁셀 회수를 위한 최적의 무기염으로 선정하였다.

3-2. 무기염을 첨가한 액-액 추출 공정의 최적화

다양한 종류의 무기염을 첨가한 1회 액-액 추출 공정에서 NaCl을 사용하였을 때 가장 높은 파클리탁셀 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. 액-액 추출에서 무기염 첨가량과 상층/하층 부피비는 매우 중요한 공정변수로 알려져 있다[16-19]. 이들 주요 공정변수의 영향을 조사하기 위하여, NaCl/용매 비 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2%(w/v), 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 16, 20, 26, 31, 36%(v/v)으로 각각 조절하여 1회 액-액 추출을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 NaCl/용매 비 1%(w/v), 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v)에서 가장 높은 파클리탁셀 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. 처음으로 상 분리가 일어나기 시작하는 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 16%(v/v)에서 낮은 파클리탁셀 수율(>70%)을 보이다가 메틸렌 클로라이드/메탄올 비가 증가할수록 파클리탁셀 수율 또한 증가하여 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v)에서 가장 높은 파클리탁셀 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. 반면 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v) 이후 수율은 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 추출용매가 증가할수록 목적 성분의 수율 또한 증가하다가 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v) 이후에는 많은 양의 추출용매로 인한 희석효과로 수율이 감소하는 것으로 판단된다[17]. 또한 NaCl/용매 비가 증가할수록 파클리탁셀 수율이 증가하여 NaCl/용매 비 1%(w/v)에서 가장 높은 수율(~96%)을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 상층(메탄올 농축액)에 존재하는 파클리탁셀이 salting-out 효과에 의해 하층(메틸렌 클로라이드 층)으로 원활히 이동하여 파클리탁셀 추출 효율을 향상된 것으로 판단된다[16-18]. 반면 NaCl/용매 비 1%(w/v) 이상에서는 파클리탁셀 수율이 감소하였다.

액-액 추출을 위한 시료 내 파클리탁셀 함량은 수율 뿐만 아니라 처리량(throughput)에도 많은 영향을 미친다[22]. 시료 내 파클리탁셀 함량에 따른 영향을 조사하기 위하여, 최적의 무기염 첨가량 [NaCl/용매 비 1%(w/v)]과 상층/하층 부피비[메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v)]에서 순수 파클리탁셀 함량 0.045, 0.066, 0.099, 0.130%(w/v)로 각각 변화시켜 1회 액-액 추출을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 수율은 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)까지는 최대치(~96%)를 보였으나 이후 감소하였다. 분배계수는 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)까지는 감소하였으나 이후 증가하였다. 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)에서 가장 높은 수율(~96%)과 가장 낮은 분배계수(0.053)를 나타내어 액-액 추출을 위한 최적 파클리탁셀 함량임을 알 수 있었다. 이러한 현상에 대한 이유를 조사하기 위하여 순수 파클리탁셀 함량 변화에 따른 하층(메틸렌 클로라이드 층)에 존재하는 파클리탁셀 함량을 분석하였다. Fig. 5에서 보는

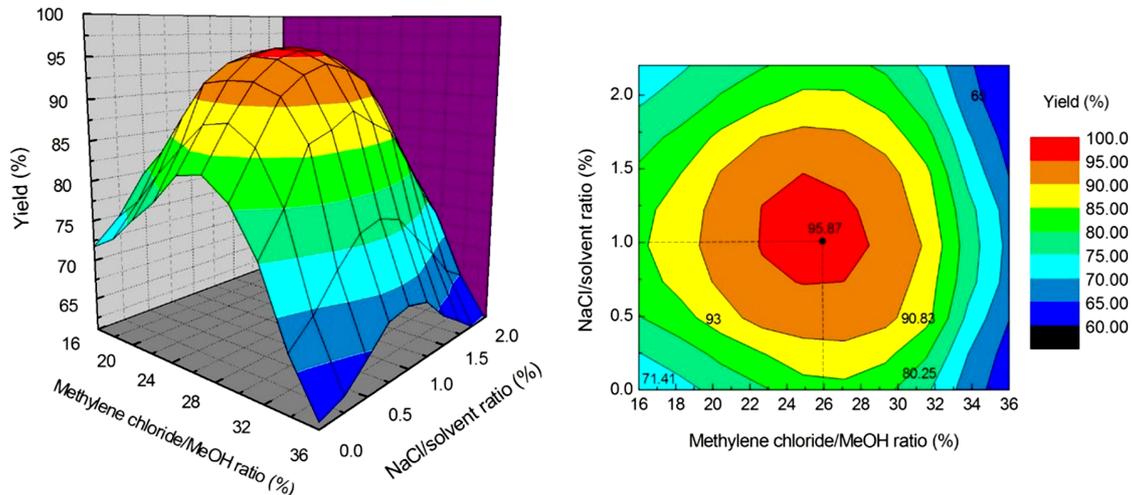


Fig. 4. 3D response surface and contour plots for the optimization of liquid-liquid extraction process with NaCl.

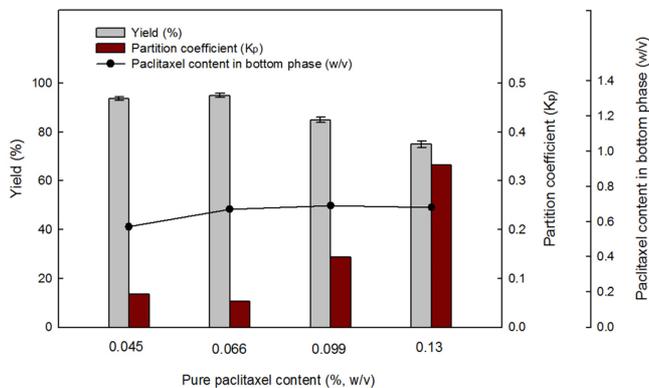


Fig. 5. Effect of pure paclitaxel content on the yield, partition coefficient, and paclitaxel content in bottom phase. The NaCl/solvent ratio and methylene chloride/MeOH ratio were 1% (w/v) and 26% (v/v), respectively.

바와 같이 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)부터 거의 일정한 파클리탁셀 함량(-0.65%, w/v)을 보였다. 즉, 액-액 추출의 동일 조건 하에서 하층에 용해될 수 있는 최대 파클리탁셀 함량(포화 농도)이 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)부터 일정함을 알 수 있었다. 따라서 액-액 추출을 위한 시료 내 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)까지는 최대 수율을 보이다가 이후 수율이 점차 감소하고, 분배계수는 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)까지는 감소하다 이후 증가하게 된다. 결과적으로 NaCl/용매 비 1%(w/v), 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v), 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)에서 가장 높은 수율(-96%)을 얻어 파클리탁셀 회수를 위한 최적의 액-액 추출 조건임을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 식물세포배양으로부터 파클리탁셀을 효율적으로 회수하기 위해 무기염을 첨가한 액-액 추출방법을 도입하였다. 기존 액-액 추출의 경우 총 3회의 추출로 파클리탁셀을 95% 정도 회수 가능한 반면 무기염을 이용한 방법의 경우 단 1회 추출로 식물세포 내 대부분의 파클리탁셀을 회수(-96%) 가능하였다. 다양한 무기염

(NaCl, KCl, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)을 첨가하여 액-액 추출을 수행한 결과, NaCl에서 가장 낮은 분배계수(0.053)로 가장 높은 파클리탁셀 수율(-96%)을 하층(메틸렌 클로라이드 층)으로부터 얻을 수 있었다. 무기염 NaCl을 이용한 액-액 추출 공정에서 NaCl/용매 비 1%(w/v), 메틸렌 클로라이드/메탄올 비 26%(v/v)에서 가장 높은 수율(-96%)을 얻어 파클리탁셀 회수를 위한 최적의 조건임을 알 수 있었다. 또한 최적의 NaCl/용매 비와 메틸렌 클로라이드/메탄올 비에서 파클리탁셀 함량에 따른 영향을 조사한 결과, 순수 파클리탁셀 함량 0.066%(w/v)에서 가장 낮은 분배계수(0.053)로 가장 높은 수율(-96%)을 얻을 수 있었다. 이러한 연구결과는 식물세포배양으로부터 항암물질 파클리탁셀을 효율적으로 회수(공정 편리성, 높은 추출 효율, 조업시간 단축, 에너지 절감 측면)하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감 사

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업의 결과물입니다(과제번호: 2015016271).

References

- Kim, J. H., "Paclitaxel : Recovery and Purification in Commercialization Step," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1-10(2006).
- Kim, G. J. and Kim, J. H., "Enhancement of Extraction Efficiency of Paclitaxel From Biomass Using Ionic Liquid-methanol Co-solvents Under Acidic Conditions," *Process Biochem.*, **50**, 989-996 (2015).
- Hsiao, J. R., Leu, S. F. and Huang, B. M., "Apoptotic Mechanism of Paclitaxel-induced Cell Death in Human Head and Neck Tumor Cell Lines," *J. Oral Pathol. Med.*, **38**, 188-197(2009).
- Rao, K., Hanuman, J., Alvarez, C., Stoy, M., Juchum, J., Davies, R. and Baxley, R., "A New Large-scale Process for Taxol and Related Taxanes from *Taxus Brevifolia*," *Pharm. Res.*, **12**, 1003-1010(1995).
- Choi, H. K., Son, J. S., Na, G. H., Hong, S. S., Park, Y. S. and Song, J. Y., "Mass Production of Paclitaxel by Plant Cell Culture," *J. Plant Biotechnol.*, **29**, 59-62(2002).

6. Baloglu, E. and Kingston, D. G. I., "A New Semisynthesis of Paclitaxel from Baccatin III;" *J. Nat. Prod.*, **62**, 1068-1071(1999).
7. Lee, C. G. and Kim, J. H., "Optimization of Adsorbent Treatment Process for the Purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures of *Taxus Chinensis*;" *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 497-502(2014).
8. Kim, J. H., Lim, C. B., Kang, I. S., Hong, S. S. and Lee, H. S., "The Use of a Decanter for Harvesting Biomass from Plant Cell Cultures;" *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 337-341(2000).
9. Kim, G. J. and Kim, J. H., "A Simultaneous Microwave-assisted Extraction and Adsorbent Treatment Process Under Acidic Conditions for Recovery and Separation of Paclitaxel from Plant Cell;" *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1023-1028(2015).
10. Pyo, S. H., Song, B. K., Ju, C. H., Han, B. H. and Choi, H. J., "Effects of Adsorbent Treatment on the Purification of Paclitaxel from Cell Cultures of *Taxus chinensis* and Yew Tree;" *Process Biochem.*, **40**, 1113-1117(2005).
11. Kim, J. H., Kang, I. S., Choi, H. K., Hong, S. S. and Lee, H. S., "A Novel Prepurification for Paclitaxel from Plant Cell Cultures;" *Process Biochem.*, **37**, 679-682(2002).
12. Kim, J. H. and Hong, S. S., "Optimization of Extraction Process for Mass Production of Paclitaxel from Plant Cell Cultures;" *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 346-351(2000).
13. Hyun, J. E. and Kim, J. H., "Microwave-assisted Extraction of Paclitaxel from Plant Cell Cultures;" *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 281-284(2008).
14. Pyo, S. H., Park, H. B., Song, B. K., Han, B. H. and Kim, J. H., "A Large-scale Purification of Paclitaxel from Cell Cultures of *Taxus chinensis*;" *Process Biochem.*, **39**, 1985-1991(2004).
15. Kim, J. H., "Optimization of Liquid-liquid Extraction Conditions for Paclitaxel Separation from Plant Cell Cultures;" *KSBB J.*, **24**, 212-215(2009).
16. Wu, J. W., Chen, H. C. and Ding, W. H., "Ultrasound-assisted Dispersive Liquid-liquid Microextraction Plus Simultaneous Silylation for Rapid Determination of Salicylate and Benzophenone-type Ultraviolet Filters in Aqueous Samples;" *J. Chromatogr. A*, **1302**, 20-27(2013).
17. Hsieh, H. K., Chen, C. L. and Ding, W. H., "Determination of Dechlorane Compounds in Aqueous Samples Using Ultrasound-assisted Dispersive Liquid-liquid Microextraction and Gas Chromatography-electron-capture Negative Ion-mass Spectrometry;" *Anal. Methods*, **5**, 7001(2013).
18. Saïen, J. and Asadabadi, S., "Salting-out Effect of NaCl on the Rate of Mass Transfer of Liquid-liquid Extraction in a Two Impinging-jets Contacting Device;" *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **41**, 295-301(2010).
19. Gao, M., Wang, H., Ma, M., Zhang, Y., Yin, X., Dahlgren, R. A., Du, D. and Wang, X., "Optimization of a Phase Separation Based Magnetic-stirring Salt-induced Liquid-liquid Microextraction Method for Determination of Fluoroquinolones in Food;" *Food Chem.*, **175**, 181-188(2015).
20. Choi, H. K., Adams, T. L., Stahlhut, R. W., Kim, S. I., Yun, J. H., Song, B. K., Kim, J. H., Song, J. S., Hong, S. S. and Lee, H. S., "Method for Mass Production of Taxol by Semi-continuous - 49 - culture with *Taxus chinensis* Cell Culture;" US. Patent No. 5,871,979 (1999).
21. Rezaeepour, R., Heydari, R. and Ismaili, A., "Ultrasound and Salt-assisted Liquid-liquid Extraction as an Efficient Method for Natural Product Extraction;" *Anal. Methods*, **7**, 3253-3259(2015).
22. Lee, J. Y. and Kim, J. H., "Influence of Crude Extract Purity and Pure Paclitaxel Content on Fractional Precipitation for Purification of Paclitaxel;" *Sep. Purif. Technol.*, **103**, 8-14(2013).