

## 식물세포배양으로부터 파클리탁셀 회수를 위한 초음파를 이용한 액-액 추출

하건수 · 김진현<sup>†</sup>

공주대학교 화학공학부  
 31080 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24  
 (2015년 9월 18일 접수, 2015년 11월 6일 수정본 접수, 2015년 11월 10일 채택)

## Ultrasound-Assisted Liquid-Liquid Extraction for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Cultures

Geon-Soo Ha and Jin-Hyun Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, 1223-24, Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam, 31080, Korea  
 (Received 18 September 2015; Received in revised form 6 November 2015; accepted 10 November 2015)

### 요 약

본 연구에서는 식물세포배양액으로부터 파클리탁셀을 효율적으로 회수하기 위하여 초음파를 이용한 액-액 추출 공정을 개발하였다. 액-액 추출을 위한 최적의 초음파 파워와 작업 시간은 주어진 하층(메틸렌 클로라이드 층)/상층(메탄올 농축액 층) 비(25%, v/v)에서 각각 250 W와 15 min임을 알 수 있었다. 최적 조건 하에서 초음파를 이용한 액-액 추출 공정의 경우 단 1 회 추출로 대부분의 파클리탁셀을 하층(메틸렌 클로라이드 층)으로부터 회수(~92%) 가능하였다. 또한 무기염 첨가에 의한 초음파 상승효과로 인하여 액-액 추출을 위하여 적절한 무기염 농도와 초음파 파워가 요구됨을 알 수 있었다.

**Abstract** – In this study, an efficient ultrasound-assisted liquid-liquid extraction process was developed for recovering of paclitaxel from plant cell cultures. The optimal ultrasonic power and operating time were 250 W and 15 min at fixed ratio of bottom phase, methylene chloride to top phase, MeOH (25%, v/v). Under the optimal conditions developed in the present method, most of the paclitaxel (~92%) was recovered from crude extract by a single extraction step. Due to the synergistic effect of ultrasound by the addition of inorganic salt, an appropriate inorganic salt concentration and the ultrasonic power were found to be required for the effective recovery of paclitaxel using ultrasound-assisted liquid-liquid extraction.

Key words: Paclitaxel, Recovery, Ultrasound-Assisted Liquid-Liquid Extraction, NaCl

### 1. 서 론

파클리탁셀(paclitaxel)은 난소암, 유방암, 두경부암(head and neck cancer), 카포시종양(kaposi's sarcoma), 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer) 치료에 효과적이며 현재 가장 널리 사용되고 있는 항암제이다[1]. 또한, 계속되는 적응증(류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료) 및 처방방법의 개발로 파클리탁셀 수요는 계속 늘어날 전망이다[2,3]. 파클리탁셀의 주요 생산 방법에는 주목나무(yew tree)에서 직접 추출하는 방법, 주목나무에서 전구체를 얻어 반합성하는 방법, 주목나무에서 캘러스(callus)를 유도하여 식물세포를 배양하여 얻는 방법이 있다[4-6]. 식물세포배양 방법은 다른 방법에 비해 외부

인자(기후, 환경)에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 제품생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 파클리탁셀을 대량 생산할 수 있는 장점이 있다[5,7]. 식물세포배양에 의하여 생산된 파클리탁셀은 대부분 바이오매스(식물세포)에 포함되어 있으며[8], 파클리탁셀 생산은 여러 단계의 추출 및 정제 공정으로 이루어져 있다[9-11]. 바이오매스로부터 파클리탁셀을 높은 수율로 먼저 분리/회수하는 것이 매우 중요하다. 일반적으로 분리/회수는 유기용매(주로 메탄올)를 이용하여 바이오매스를 추출한 후 액-액 추출을 통해 추출액으로부터 다량의 극성 불순물을 제거하는 공정으로 이루어져 있다[12,13]. 기존 문헌에 의하면 다양한 종류의 유기용매를 이용하여 액-액 추출을 수행한 결과[14], 파클리탁셀 순도/수율 및 극성불순물 제거 측면에서 메틸렌 클로라이드가 가장 효과적임을 알 수 있었다. 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

<sup>†</sup>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.

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.

초음파(ultrasound)를 이용한 액-액 추출은 바이오매스로부터 목적 성분의 회수 효율을 향상시킬 수 있다는 점에서 매우 효과적인 방법으로 보고되어 있다[16-19]. 초음파를 이용한 액-액 추출 방법은 공정이 단순하며 기존의 추출 방법에 비하여 추출효율 향상, 조업시간 단축, 공정 편리성 그리고 에너지 절감 등 다양한 효과를 기대할 수 있다[19]. 따라서 본 연구에서는 초음파를 이용한 액-액 추출에 의해 파클리탁셀 회수 방법을 획기적으로 개선하고자 하였다. 즉, 초음파를 이용한 액-액 추출 공정에서의 주요 공정 변수인 초음파 파워(ultrasonic power)와 조업 시간을 최적화하여 단 1회의 액-액 추출로 대부분의(>90%)의 파클리탁셀을 회수하고자 하였다. 더 나아가 salting-out 효과가 우수한 무기염(NaCl)을 첨가하여 초음파를 이용한 액-액 추출에서의 효율 상승효과(synergistic effect)를 조사하였다. 이러한 연구결과는 식물세포배양으로부터 항암물질 파클리탁셀을 효율적으로 회수하는데 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 식물재료

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(medium)로 갈아주었고, 배양 시간을 연장시키기 위해 7 일과 21 일 쯤 되는 날에 1~2% (w/v)의 maltose를 첨가해 주고 elicitor로서 배양 초기에 4 mM의 AgNO<sub>3</sub>를 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 사용된 바이오매스는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

### 2-2. 바이오매스 추출 및 초음파를 이용한 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. 액-액 추출을 위하여, 메탄올 농축액에 메틸렌 클로라이드(메탄올 농축액의 25%)를 첨가하여 상온에서 혼합 후 30분 동안 정체시켜 상 분리(상층: 메탄올 농축액 층, 하층: 메틸렌 클로라이드 층)를 유도하였다[14]. 상 분리 후 40 kHz ultrasonic cleaner (UC-10, Jeiotech, Korea)를 이용하여 초음파 파워(ultrasonic power) (80, 180, 250, 380, 530 W)와 조업 시간(5, 10, 15, 20, 25, 30 min)을 변화시켜 최적 조건을 선정하였다. 초음파를 이용한 액-액 추출 후 상 분리로부터 파클리탁셀을 함유하고 있는 하층(메틸렌 클로라이드 층)을 회수하여 농축하고

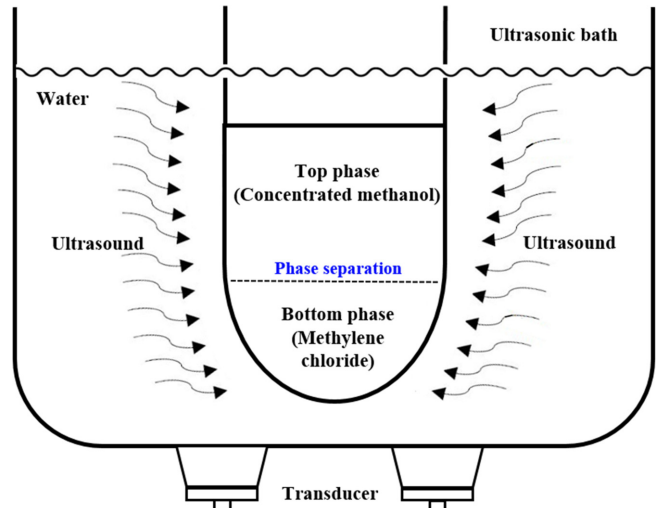


Fig. 1. Schematic diagram of the ultrasound-assisted liquid-liquid extraction process.

진공건조(40 °C, overnight, 760 mmHg)하여 HPLC 분석을 통해 파클리탁셀 순도와 수율을 측정하였다. 초음파를 이용한 액-액 추출 공정을 Fig. 1에 나타내었다. 또한 파클리탁셀 수율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Yield (\%)} = \left[ \frac{\text{quantity of paclitaxel in bottom phase}}{\text{quantity of paclitaxel in feed}} \right] \times 100 \quad (1)$$

### 2-3. 파클리탁셀 분석

파클리탁셀 함량 분석을 위해 HPLC 시스템(Waters, USA)과 Capell Pak C<sub>18</sub> (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]. HPLC 분석은 표준정량곡선을 이용하였으며 표준시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: >97%)을 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 초음파를 이용한 액-액 추출 효율

식물세포배양에 의해 생산된 파클리탁셀은 대부분 바이오매스(식물세포)에 포함되어 있으며, 먼저 메탄올을 이용하여 바이오매스를 추출하고 메틸렌 클로라이드를 이용하여 액-액 추출을 수행하여 파클리탁셀을 분리/회수한다[15]. 초음파 처리를 하지 않은 기존의 액-액 추출은 1회 추출 시 75%, 2회 추출 시 15%, 3회 추출 시 9% 파클리탁셀이 각각 회수되어 총 3회의 추출로 대부분의 파클리탁셀 회수가 가능하였다(Fig. 2). 본 연구에서는 초음파를 이용한 액-액 추출에 의해 1회 추출로 대부분의 파클리탁셀을 회수하고자 하였다. 주요 공정 변수 최적화를 위하여, 기존 문헌[14]에서 최적의 하층/상층 부피 비(25%, v/v)를 일정하게 하고 초음파 파워와 조업 시간에 따른 영향을 조사하였다. 초음파 파워(80, 180, 250, 380, 530 W)와 조업 시간(5, 10, 15, 20, 25, 30 min)을 각각 변화시켜 1회 액-액 추출을 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 초음파 파워 80 W에서는

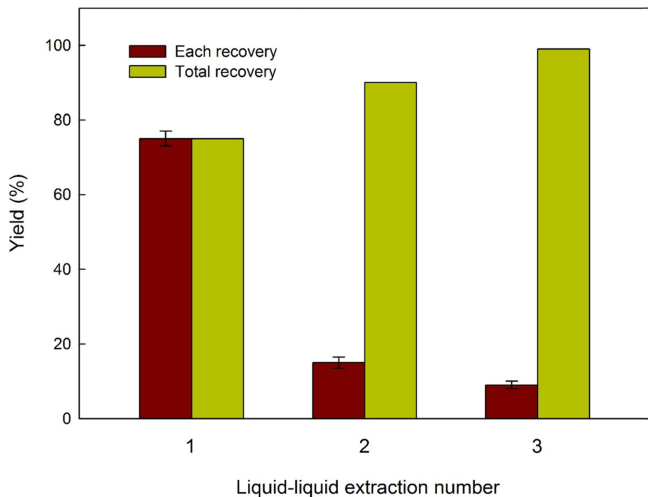


Fig. 2. Effect of liquid-liquid extraction number on the yield of paclitaxel using conventional liquid-liquid extraction method. The methylene chloride/MeOH ratio was 25% (v/v).

비교적 낮은 파클리탁셀 수율(~78%)을 보였으나 초음파 파워가 증가할수록 수율이 증가하여 250 W에서 가장 높은 수율(~92%)을 얻을 수 있었다. 반면 초음파 파워 250 W 이후에는 파클리탁셀 수율이 급격하게 감소하였다. 조업 시간이 증가할수록 파클리탁셀 수율 또한 증가하여 조업 시간 15 min에서 가장 높은 수율(~92%)을 얻을 수 있었다. 초음파 파워 250 W 이하 구간에서는 조업 시간 15 min 이후에도 수율 변화가 거의 없었지만 초음파 파워 250 W 이상 구간에서는 수율이 급격하게 감소하였다. 초음파 파워 80~250 W 구간에서는 초음파 파워가 증가할수록 초음파에 의해 생성된 기포(bubble)가 하층으로 더 효과적으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 조업 시간이 경과할수록 초음파에 의해 생성된 기포가 하층으로 더 효과적으로 이동하다 15 min 이후에는 거의 변화가 없었다. 상층 벌커(bulk)의 표면장력(surface tension)으로 인해 파클리탁셀은 벌커-기포 경계면(bulk-bubble interface)으로 이동하여 기포와 함께 하층으로 효과적으로 전달되어 회수율이 증가하는 것으로 판

단된다[21,22]. 반면 초음파 파워 250 W 이상 구간에서는 초음파 파워가 증가할수록 초음파에 의해 생성된 기포가 미세한 기포로 쪼개지면서 하층보다 오히려 상층으로 더 분산되어 이동함을 관찰할 수 있었다. 또한 조업 시간이 경과할수록 초음파에 의해 생성된 기포가 미세하게 쪼개지면서 하층보다 상층으로 더 분산되어 이동하였다. 결국 기포 경계면으로 이동한 파클리탁셀은 기포와 함께 상층으로 더 많이 전달되어 하층에서 회수율이 감소하는 것으로 판단된다. 이러한 기포 이동 양상은 초음파 파워 300 W 이하 구간에서는 기포가 일정한 방향으로만 효과적으로 이동되는 반면 초음파 파워 300 W 이상 구간에서는 기포가 쪼개지면서 사방으로 분산되는 기존의 연구결과와 상당히 일치함을 알 수 있었다[23]. 일반적으로 높은 초음파 파워를 이용한 액-액 추출 공정에서 수율 감소는 높은 초음파 파워에서 장시간 노출에 따른 목적성분의 분해에 기인하는 것으로 알려져 왔다[17,18]. 높은 초음파 파워(530 W)에서 장시간(400 min) 노출에 따른 파클리탁셀의 분해 여부를 조사한 결과, 초음파 처리 후에도 파클리탁셀의 순도(~99%)에는 전혀 변화가 없었다(data not shown). 이러한 결과로부터 높은 초음파 파워(>250 W)에서 장시간 노출로 인한 수율 감소는 파클리탁셀 분해가 아닌 초음파 파워에 따른 기포 형상과 이동(물질전달)의 영향임을 재확인 할 수 있었다. 초음파 처리 유무에 관계 없이 액-액 추출에서 얻은 파클리탁셀 순도(>15%)는 거의 차이가 없음을 알 수 있었다(data not shown). 결과적으로 초음파를 이용한 액-액 추출에서 초음파 파워 250 W, 조업 시간 15 min에서 1회 추출로 가장 높은 파클리탁셀 수율(~92%)을 하층(메틸렌 클로라이드 층)으로부터 얻을 수 있었다.

### 3-2. 초음파를 이용한 액-액 추출에서 무기염의 영향

최근 무기염(NaCl)을 이용한 액-액 추출이 salting-out 효과로 파클리탁셀의 추출 효율을 향상 시키는데 매우 효과적인 방법으로 보고되고 있다[24]. 또한 초음파를 이용한 추출 공정에서 무기염 첨가에 따른 상승효과로 추출 효율에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[25]. 무기염이 초음파를 이용한 액-액 추출 효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl/solvent ratio 1% (w/v)[24], 초음파 파워 250 W에서 조업 시간(5, 15, 30 min)을 변화시켜 1회 액-액 추출을 수행하

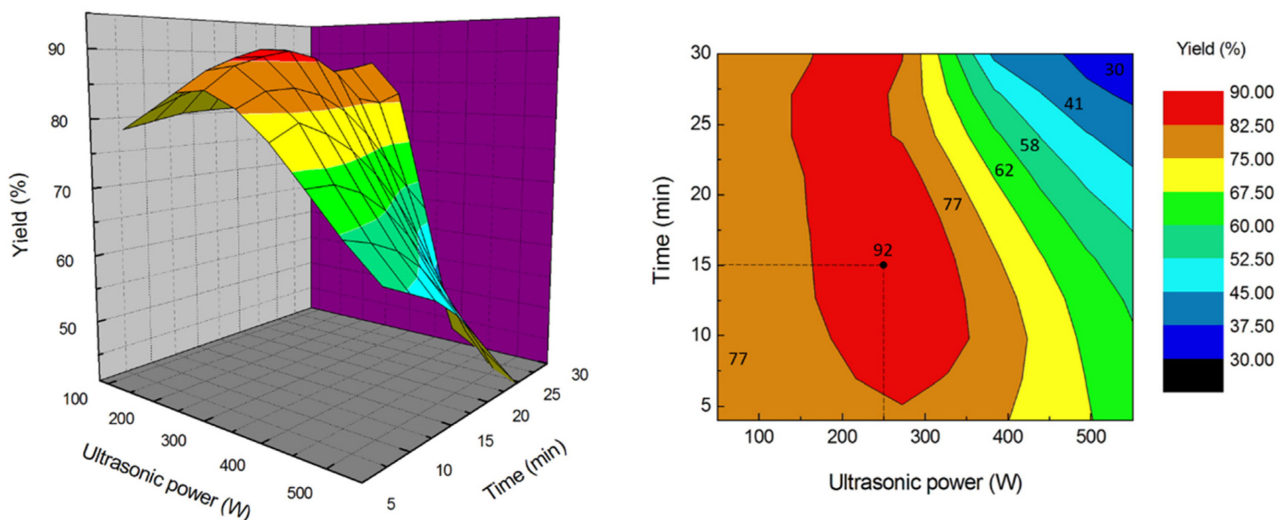


Fig. 3. 3D response surface and contour plots for the optimization of ultrasound-assisted liquid-liquid extraction process. The methylene chloride/MeOH ratio was 25% (v/v).

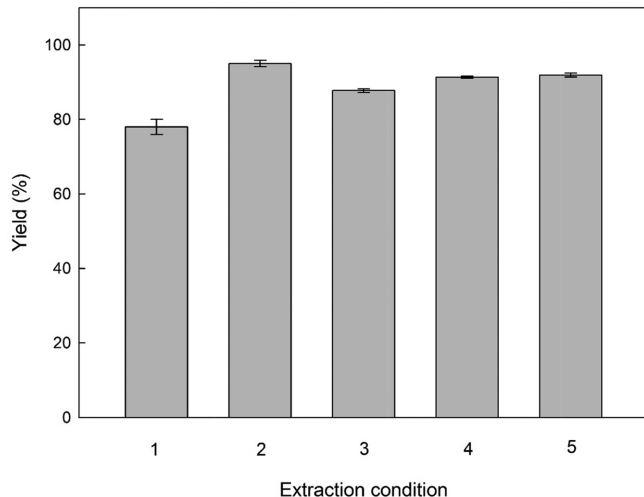


Fig. 4. Effect of liquid-liquid extraction condition on the yield of paclitaxel. 1: Control (yield obtained by conventional liquid-liquid extraction process), 2: Liquid-liquid extraction with salt (NaCl/solvent ratio=1%, w/v), 3: Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction with salt (NaCl/solvent ratio=1%, w/v) for 5 min, 4: Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction with salt (NaCl/solvent ratio=1%, w/v) for 15 min, 5: Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction with salt (NaCl/solvent ratio=1%, w/v) for 30 min.

였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 초음파를 이용한 액-액 추출에 NaCl을 첨가한 경우 NaCl만을 첨가하여 액-액 추출한 경우보다 파클리탁셀 수율이 오히려 감소하였다. 또한 NaCl/solvent ratio 1.0% (w/v), 조업 시간 15 min에서 초음파 파워(80, 180, 250, 380, 530 W)를 변화시켜 1회 액-액 추출을 수행한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 초음파 파워 250 W 이하 구간에서는 NaCl이 첨가된 경우 더 높은 파클리탁셀 수율을 나타내었다. 반면 초음파 파워 250 W 이상 구간에서는 NaCl이 첨가된 경우 파클리탁셀 수율이 현저하게 감소하였다. 초음파 파워 80~180 W 구간에서는 NaCl 첨가에 따른 상승효과로 초음파에 의해 생성된 기포가 하층으로 더 효과적으로 이동하는

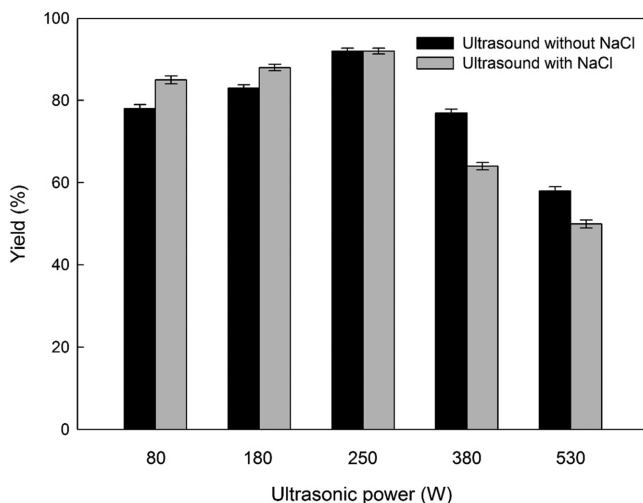


Fig. 5. Effect of ultrasonic power on the ultrasound-assisted liquid-liquid extraction process with and without salt (NaCl). The NaCl/solvent ratio and operating time were 1.0% (w/v) and 15 min, respectively.

것을 관찰할 수 있었다. 또한 초음파 파워가 증가할수록 기포가 하층으로 더 효과적으로 이동하다 초음파 파워 250 W에서는 거의 변화가 없었다. 이로 인해 파클리탁셀 또한 하층으로 효과적으로 전달되어 회수율이 증가하는 것으로 판단된다. 반면 초음파 파워 380~530 W 구간에서는 NaCl 첨가에 따른 상승효과로 초음파에 의해 생성된 기포가 더 많은 미세한 기포로 쪼개지면서 하층보다 상층으로 더 분산되어 이동하였다. 이로 인해 더 많은 파클리탁셀이 상층으로 이동되어 회수율이 오히려 감소하는 것으로 판단된다[23,26]. 결과적으로 NaCl 첨가에 따른 상승효과로 초음파 파워 250 W이하 구간에서는 무기염 첨가에 의해 파클리탁셀 회수율이 증가한 반면 초음파 파워 250 W 이상 구간에서는 회수율이 오히려 감소하였다. 즉, 무기염과 초음파를 이용한 액-액 추출에서 파클리탁셀 수율을 극대화하기 위하여 적절한 무기염 농도와 초음파 파워가 요구됨을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 초음파를 이용한 액-액 추출에 의해 식물세포인 바이오매스로부터 파클리탁셀 회수 방법을 획기적으로 개선하고자 하였다. 기존 액-액 추출의 경우 총 3회의 추출로 바이오매스 추출물로부터 대부분의 파클리탁셀을 회수 가능한 반면 초음파 처리를 이용한 액-액 추출의 경우 단 1 회 추출로 식물세포 내 대부분의 파클리탁셀을 회수(~92%) 가능하였다. 초음파를 이용한 액-액 추출에서 최적의 초음파 파워와 조업 시간은 각각 250 W, 15 min 이었다. 이러한 결과는 초음파 파워와 조업 시간 변화에 따른 기포 형상과 이동(물질전달)의 흐름에 기인하는 것으로 판단된다. 또한 초음파를 이용한 액-액 추출에서 무기염(NaCl)을 첨가한 경우, 초음파 상승효과(synergistic effect)로 인하여 회수율을 극대화하기 위해서는 적절한 무기염 농도와 초음파 파워가 요구됨을 알 수 있었다. 이러한 연구결과는 식물세포배양으로부터 항암물질 파클리탁셀을 효율적으로 회수하는데 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 Cosolvents 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. Pachaiyappan, A., Varathan, S. and Venugopal, R., "Sonication Effect on the Reaction of 4-bromo-1-methylbenzene with Sodium Sulfide in Liquid-liquid Multi-site Phase-transfer Catalysis Condition - Kinetic Study," *Ultrason. Sonochem.*, **23**, 156-164(2015).
17. Guo, Y. X., Han, J., Zhang, D. Y., Wang, L. H. and Zhou, L. L., "An Ammonium Sulfate/ethanol Aqueous Two-phase System Combined with Ultrasonication for the Separation and Purification of Lithospermic Acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge," *Ultrason. Sonochem.*, **19**, 719-724(2012).
18. Reza, R., Rouhollah, H. and Ahmad, L., "Ultrasound and Salt-assisted Liquid-liquid Extraction as an Efficient Method for Natural Product Extraction," *Anal. Methods.*, **7**, 3253(2015).
19. Ming, G., Huili, W., Meiping, M., Yuna, Z., Xiaohan, Y., Randy D., Dongli, D. and Xuedong, W., "Optimization of a Phase Separation Based Magnetic-stirring Salt-induced Liquid-liquid Micro-extraction 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 Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture," US. Patent No. 5,871,979(1999).
21. Findik, S. and Gunduz, G., "Sonolytic Degradation of Acetic Acid in Aqueous Solutions," *Ultrason. Sonochem.*, **14**, 157-162(2007).
22. Mukesh, G., Hu, H., Arun, S. M. and Madhumita, B. R., "Sonochemical Decomposition of Volatile and Non-volatile Organic Compounds a Comparative Study," *Water Res.*, **38**, 4247-4261(2004).
23. Jagannathan, T. K., Nagarajan, R. and Ramamurthi, K., "Effect of Ultrasound on Bubble Breakup Within the Mixing Chamber of An Effervescent Atomizer," *Chem. Eng. Process.*, **50**, 305-315(2011).
24. Ha, G. S. and Kim, J. H., "Liquid-liquid Extraction for Recovery of Paclitaxel from Plant Cell Cultures by Adding Inorganic Salts," *Korean Chem. Eng. Res.*, In press(2015).
25. Eiji, I., Masako, N., Nobuyuki, K. and Kenji, K., "Synergy Effect of Ultrasonication and Salt Addition on Settling Behaviors of Activated Sludge," *Sep. Purif. Technol.*, **144**, 177-185(2015).
26. Cesar, O., Ana, P., Jose, V. G., Antonio, M. and Juan, A. C., "Influence of High Intensity Ultrasound Application on Mass Transport, Microstructure and Textural Properties of Pork Meat (*Longissimus dorsi*) Brined at Different NaCl Concentrations," *J. Food Eng.*, **119**, 84-93(2013).