

Botryococcus sp.의 생장에 미치는 광도와 영양염류의 영향

오희목* · 김성빈 · 박준홍 · 박응로¹ · 이성택¹ · 권기석 · 윤병대
생명공학연구소 환경미생물RU, ¹한국과학기술원 생물과학과

Effects of Light Intensity and Nutrients on the Growth of *Botryococcus* sp. Hee-Mock Oh*, Seong-Bin Kim, Jun-Hong Park, Eung-Roh Park¹, Sung-Taik Lee¹, Gi-Seok Kwon and Byung-Dae Yoon. *Environmental Microbiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea, ¹Dept. of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea* - Under the light intensity of 25-72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ *Botryococcus braunii* UTEX 572 grew faster than *Botryococcus* sp. GE 24 isolated from a freshwater lake. The specific growth rate (μ) of *B. braunii* UTEX 572 was highest at 0.260 (1/day) on a dry weight basis in Chu 13 medium from 1 to 9 days of incubation and then continuously decreased. Carbohydrate concentration and cellular nitrogen and phosphorus contents of *B. braunii* UTEX 572 gradually decreased with light intensity over a range of 25-72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, whereas the concentrations of protein and cellular N:P ratio increased with light intensity. Chlorophyll-*a* concentration showed a decreasing tendency with light intensity. The dry weight of *B. braunii* UTEX 572 increased in the highest rate of 83 mg/l/day at pH 8.0. When the N:P ratio of Chu 13 medium was adjusted to 50:1 by addition of nitrogen source, dry weight increasing rate was 115 mg/l/day between 20 and 28 days of incubation which was the highest value during the cultivation. Cell growth in an open culture of *B. braunii* UTEX 572 was highest with Chu 13 medium, whereas that with Chu 13 medium adjusted to pH 7.0, containing 250 mg/l penicillin, or containing 1% glucose was reduced on a large scale. However, this result shows the possibility of the mass cultivation of *B. braunii* UTEX 572 in an open system competing with other microorganisms.

산업화와 생활수준 향상에 따라 에너지의 수요는 폭발적으로 증가하고 있으나 에너지 자원은 한정되어 있다. 따라서, 앞으로 고도의 산업사회가 필요로 하는 각종 에너지에 대한 수요를 충족하기 위해서는 매장된 원유, 석탄 등의 추가 발견과 대체에너지자원의 개발이 절실히 요구된다. 미세조류를 이용한 대체에너지 개발은 1970년대 석유파동이 일어나면서 태양에너지를 이용한 재생생물자원(renewable bioresource)의 개발에 관심이 집중되면서 본격적으로 연구되기 시작하였다(1).

미세조류 중에서 군체성의 녹조인 *Botryococcus braunii*는 탄화수소의 탁월한 저장능 및 자연상태에서의 bloom형성으로 인하여 재생 연료원으로 주목되었다. 1976년 호주의 Darwin River Reservoir에서는 40헥타르의 수역에서 *B. braunii*의 대규모 bloom이 형성되어 약 1,500톤의 건량을 형성하고 이중 30%가 오일성분으로 조사된 바 있다(2). *B. braunii*는 탄화수소의 함량이 높으며, 질소원이 결핍된 상태에서 탄화수소의 함량이 더욱 증가하는 것으로 보고되었다(3-5). 미세조류는 배양시의 광도, 광주

기, 영양염류의 조성, 배양온도 및 chilling effects 등에 따라 생리적 특성이 변화하며, 세포 구성성분 및 세포생장이 달라진다(6-8). 실제로 *B. braunii*는 20°C에서 무기염류배지로 정치 배양하였을 때 generation time은 약 1주일이지만, 26°C에서 shaking과 1%의 CO₂를 포함한 공기를 공급하면서 배양할 경우 generation time은 약 2.5일로 단축되었다(9). 그러나 *Botryococcus* sp.는 타 조류 종(species)에 비하여 생장률이 낮아 물질생산률이 높지 않으므로 좀더 경제적으로 탄화수소를 생산하기 위해서는 우량균주의 개발과 함께 생장률을 높이기 위한 배지선택 및 최적 배양조건의 확립이 우선적으로 필요하다.

따라서, 본 연구는 자연계로부터 생장이 우수한 *Botryococcus* sp.를 탐색하며, 배지조성, 환경조건에 따른 *Botryococcus* sp.의 생장, 세포 구성성분, 광합성 등 생리 생화학적 특성을 조사하여, 배양의 최적조건을 확립하고자 하였다. 또한 배지를 멸균하지 않고 공기중에 노출된 상태로 배양하는 open culture를 통하여 *Botryococcus* sp.의 자연상태에서의 대량배양의 가능성을 조사하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4321, Fax. 82-42-860-4594

E-mail: heemock@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: *Botryococcus* sp. Cell growth, Light intensity, Nitrogen, Phosphorus

재료 및 방법

미세조류 및 배지

미세조류는 Micropipette기법(10)을 이용하여 자연계에서 분리한 *Botryococcus* sp. GE 24와 UTEX(The University of Texas at Austin)에서 분양받은 *Botryococcus braunii* UTEX 572를 실험재료로 사용하였다. 미세조류의 배양은 Allen 배지(11)와 Chu 13 배지(12)를 이용하였다.

미세조류의 배양

미세조류의 회분식 배양은 온도와 광도가 조절되는 shaking incubator를 이용하였다. Incubator의 온도는 25°C이고, shaking은 90 rpm으로 조정하였으며, 광도는 실험조건에 따라 10-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조절하였다. 또한 미세조류의 생장에 중요한 영양염류인 질소와 인의 영향을 분석하기 위하여 배지의 인 농도를 460 μM 로 고정하고 질소 농도를 변화시켜 배지의 N:P ratio를 2:1, 10:1, 20:1, 50:1 그리고 120:1로 조절하여 *B. braunii*의 생장을 조사하였다. Open culture는 2 L 용량의 삼각플라스크에 1 L의 배지를 멸균하지 않고 첨가한 후 미세조류를 접종하고 공기중에 노출된 상태로 배양하였다. 이때 광도는 60 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 조절하였고, 통기상태(300 ml/l/min)로 상온에서 배양하면서 Chu 13 배지의 대조구와 penicillin, pH 7.0, glucose 1% 등의 처리구에서 세포생장을 조사하였다.

Biomass 측정

미세조류의 biomass는 건량, 엽록소 *a* 농도 또는 흡광도에 의해 산정하였다. 건량은 시료를 Whatman GF/C filter로 여과한 후 여과된 고형물을 80°C에서 24시간 건조하여 측정하였다. 엽록소 *a* 농도를 측정하기 위하여 시료 10 ml을 Whatman GF/F filter로 여과한 후 이 여과지를 포화 MgCO_3 가 첨가된 90% cold-acetone용액에 24시간 담가두어 엽록소를 추출하였다. 이 추출액을 Whatman 934-AH filter로 여과한 후 750, 664, 647, 630 nm에서 분광광도계(Shimadzu 160A)로 흡광도를 측정하여 엽록소 *a* 농도를 산출하였다(13). 또한 680 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 biomass의 변화를 추적하였다. 미세조류의 비증식속도(specific growth rate, μ)는 배양시간 t_0 (일)와 t_1 (일)에서의 건량인 N_0 (mg/l)와 N_1 (mg/l)을 조류의 세포밀도로 하여 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\mu = \ln(N_1/N_0)/(t_1 - t_0)$$

세포의 성분분석

세포내 총인과 총질소는 시료를 persulfate방법에 따라 인 또는 질소를 인산염과 질산염으로 각기 산화시킨 후 분석하였다(14, 15). 즉, 냉장 보관된 시료 4 ml에 0.67% potassium persulfate용액(0.30% NaOH첨가) 6 ml을

가하고 고압 멸균기를 이용하여 120°C에서 45분간 가열하여 완전히 산화시켰다. 산화된 시료에 0.3 N HCl 0.6 ml을 가하여 vortex한 후 완충용액(3.0% boric acid, 2.0 N NaOH) 0.8 ml과 증류수 8.6 ml을 가하여 과황산염으로 산화 처리하여, 시료내 인과 질소를 정인산염(PO_4^{3-}P)과 질산염의 형태로 변화시켰다. 정인산염은 시료를 phosphomolybdate법으로 발색시킨 후 5-cm light path의 cuvette을 사용하여 885 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고(16), 질산염은 Szechrome NB 시약(Poly-science Inc.)을 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(17).

세포내 탄수화물은 glucose를 standard로 하여 phenol-sulfuric acid방법에 따라 490 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(18). 세포내 단백질은 시료 1 ml당 1.0 N NaOH 9 ml을 첨가하여 100°C에서 1시간 가열하여 추출한 후(17), bovine serum albumin을 standard로 하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(19). 광도에 따르는 세포 구성성분의 변화양상을 파악하기 위하여 다양한 함수에 의한 curve fitting을 수행하여 최적의 함수를 구하였다.

광합성을 측정

미세조류의 광합성률은 배양체 시료에 ^{14}C 로 표지된 sodium bicarbonate를 처리한 후 배양조건의 광도에서 일정시간 정치하여 반응시켰다. 광합성을 중지시키고 단위시간당 흡수된 방사능을 Liquid Scintillation Counter(Beckman LS 6000TA)로 계수하여 단위 건량 또는 엽록소 *a* 함량에 대한 광합성률을 산출하였다.

결과 및 고찰

Botryococcus sp.의 선별

광도가 25-72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 각기 다른 조건하에서 20일간 배양된 *Botryococcus* sp. GE 24와 *B. braunii* UTEX 572의 건량을 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. *Botryococcus* sp. GE 24의 건량은 65 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 까지는 광도의 증가에 따라 큰 변화가 없으며, 72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 에서는 감소하였다. 반면에 *B. braunii* UTEX 572는 광도의 증가에 따라 건량이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 광도가 72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 일 때 *B. braunii* UTEX 572의 건량은 0.66 g/l로 가장 높았다. 따라서 조사된 광도의 범위에서 세포생장이 우수한 *B. braunii* UTEX 572를 실험군주로 선별하였다.

Allen과 Chu 13 배지에서 세포생장

B. braunii UTEX 572를 Allen과 Chu 13 배지에서 배양하면서 배양 단계별로 세포생장과 엽록소 *a* 농도를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양 9일에 건량증가율은

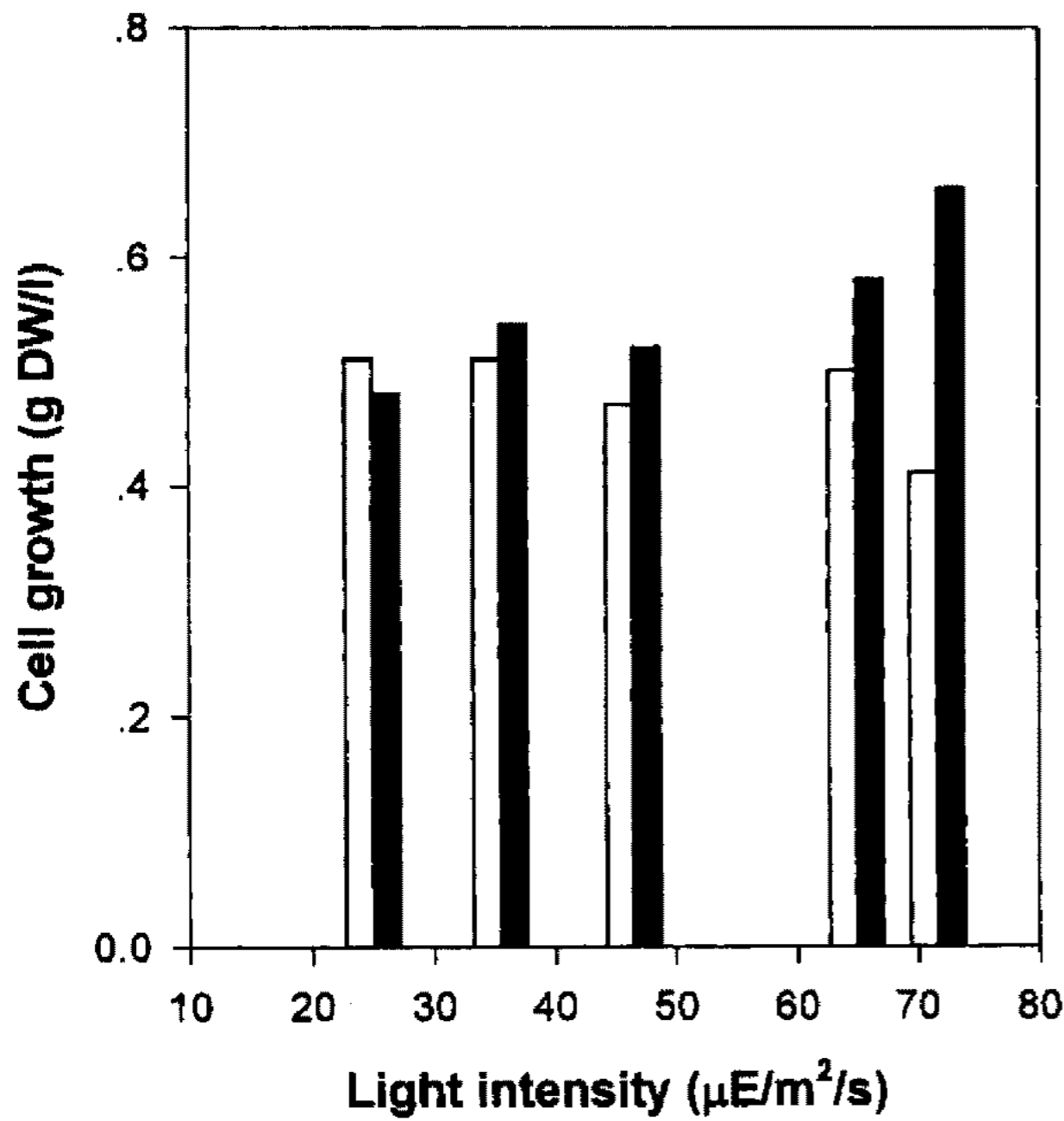


Fig. 1. Cell growth of *Botryococcus* sp. GE 24 (□) and *B. braunii* UTEX 572 (■) grown for 20 days under different light intensity.

Allen과 Chu 13 배지에서 각기 10.0과 17.5 mg/l/day이며, 배양 34일에는 Allen과 Chu 13 배지에서 각기 13.0과 12.7 mg/l/day이었다. 즉, *B. braunii* UTEX 572의

건량은 배양 17일까지 Chu 13 배지에서 높았으나, 배양 25일 이후에는 Allen 배지에서 다소 높았다. 이때 건량의 증가에 기초한 *B. braunii* UTEX 572의 비증식속도는 배양 1-9일에 Chu 13 배지에서 0.260 /d로 가장 높았으며, 배양시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 이것은 자연계에서와 마찬가지로 *B. braunii*의 실험실 배양에서 비증식속도가 대개 0.099 /d로 매우 낮다는 보고(20)와 비교할 때 비교적 높은 값으로 판단된다. 한편 배양조건에 따라 비증식속도는 변화하며, *B. braunii*의 건량에 기초한 비증식속도는 0.315 /d이고, 단백질 함량에 기준한 비증식속도는 0.692 /d로서 건량보다는 단백질 함량의 증가가 월등하였다(21).

엽록소 a 농도는 배양단계에 따라 큰 폭으로 변화되었으며, Chu 13 배지에서 엽록소 a 농도는 배양 25일에 479 μg/l로 최대값을 보이고, 그 이후에는 급격히 감소하였다. Allen 배지의 경우 엽록소 a 농도는 배양 34일에 최대값으로 438 μg/l이었다. 즉, Chu 13 배지에서 *B. braunii* UTEX 572의 왕성한 성장 이후에 엽록소 a 농도가 급속히 감소하였다. 결과적으로 배양 17일까지의 배양 초기에 Chu 13 배지에서 *B. braunii* UTEX 572의 생장이 활발하며, 배양 후기에는 Allen 배지에서 생장이 우세하였다.

Allen과 Chu 13 배지에서 배양된 *B. braunii* UTEX 572의 배양 단계별 광합성률은 Table 1에 요약하였다. Allen 배지에서 배양 9일에 광합성률은 1.070 g C/g Chl/h 또는 1.170 mg C/g dry wt/h였으며, 배양기간이 길어짐에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. Chu 13 배지의 경우에는 배양 17일에 건량에 기반한 광합성률이 0.719 mg C/g dry wt/h로 가장 높았으며, 배양기간이 길어지면서 감소하는 추세를 보였다. 이것은 *B. braunii*의 광합성률은 200 μE/m²/s의 광도와 25°C의 배양조건에서 배양 초기부터 3주까지 최대 광합성률을 조사한 결과 1.69-0.97 mg C/g dry wt/h로 배양기간이 길어짐에 따라 점차 감소한다는 보고(5)와 일치하는 것이다. 한편 Chu 13 배지에서 엽록소 a 농도에 기반한 광합성률은 배양 34일에 0.461 g C/g Chl/h로 가장 높게 나타났다. 이는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 Chu 13 배지에서 배양

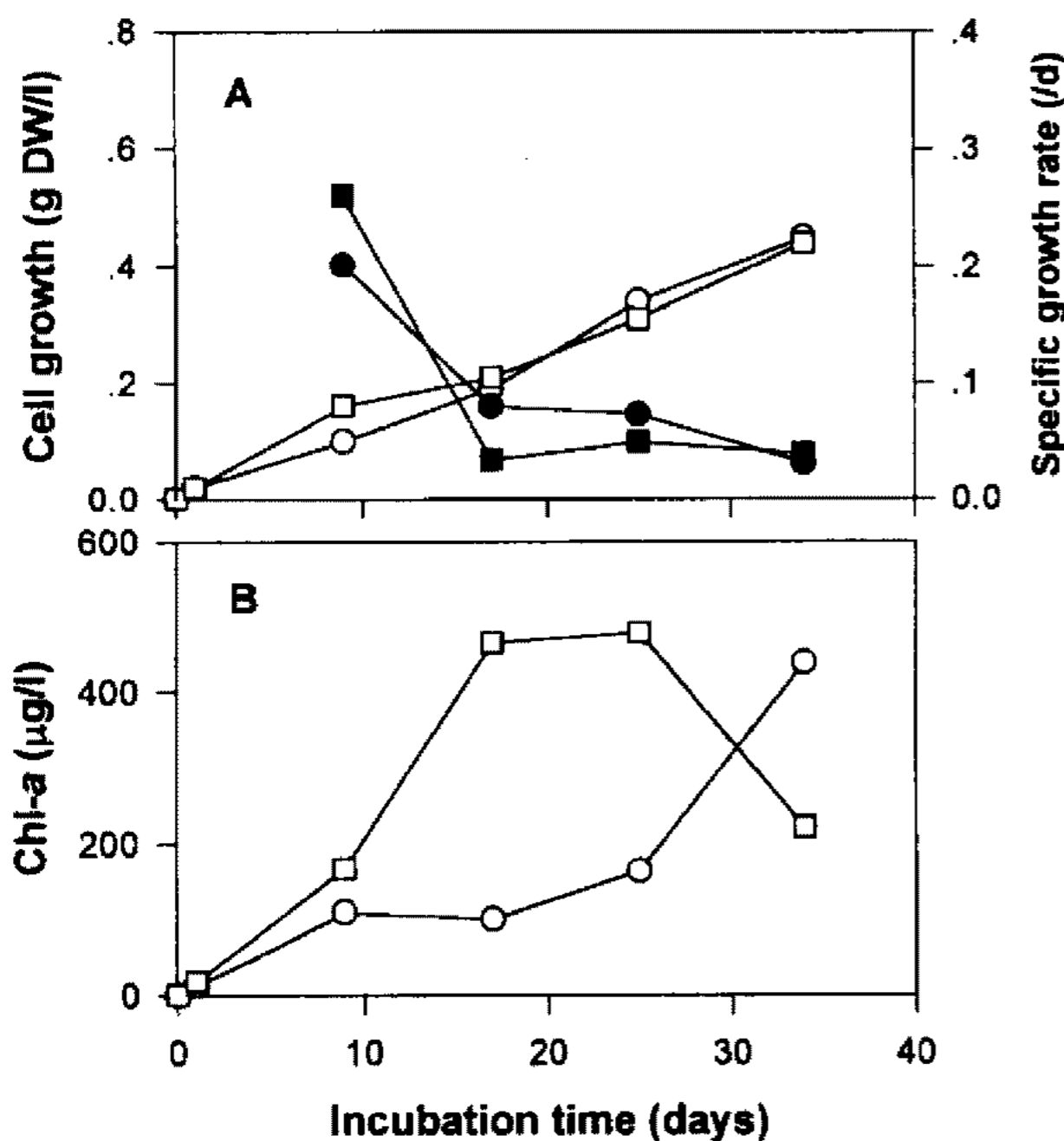


Fig. 2. (A) Cell growth and specific growth rate of *B. braunii* UTEX 572 grown in Allen medium or Chu 13 medium. Symbols are: cell growth in Allen medium (○) or in Chu 13 medium (□), specific growth rate in Allen medium (●) or in Chu 13 medium (■). (B) Chl-a content of *B. braunii* UTEX 572 grown in Allen medium (○) or Chu 13 medium (□). Culture conditions were: temperature, 25 °C; light intensity, 100 μE/m²/s; shaking, 90 rpm.

Table 1. Carbon fixation of *B. braunii* UTEX 572 at different ages of culture in Allen or Chu 13 medium

Incubation (days)	Allen medium		Chu 13 medium	
	g C/g Chl/h	mg C/g dry wt/h	g C/g Chl/h	mg C/g dry wt/h
9	1.070	1.170	0.343	0.302
17	0.948	0.501	0.325	0.719
25	0.652	0.314	0.255	0.393
34	0.178	0.174	0.461	0.231

This experiment was carried out at an irradiance of 100 μE/m²/s which was an ambient irradiance for the culture.

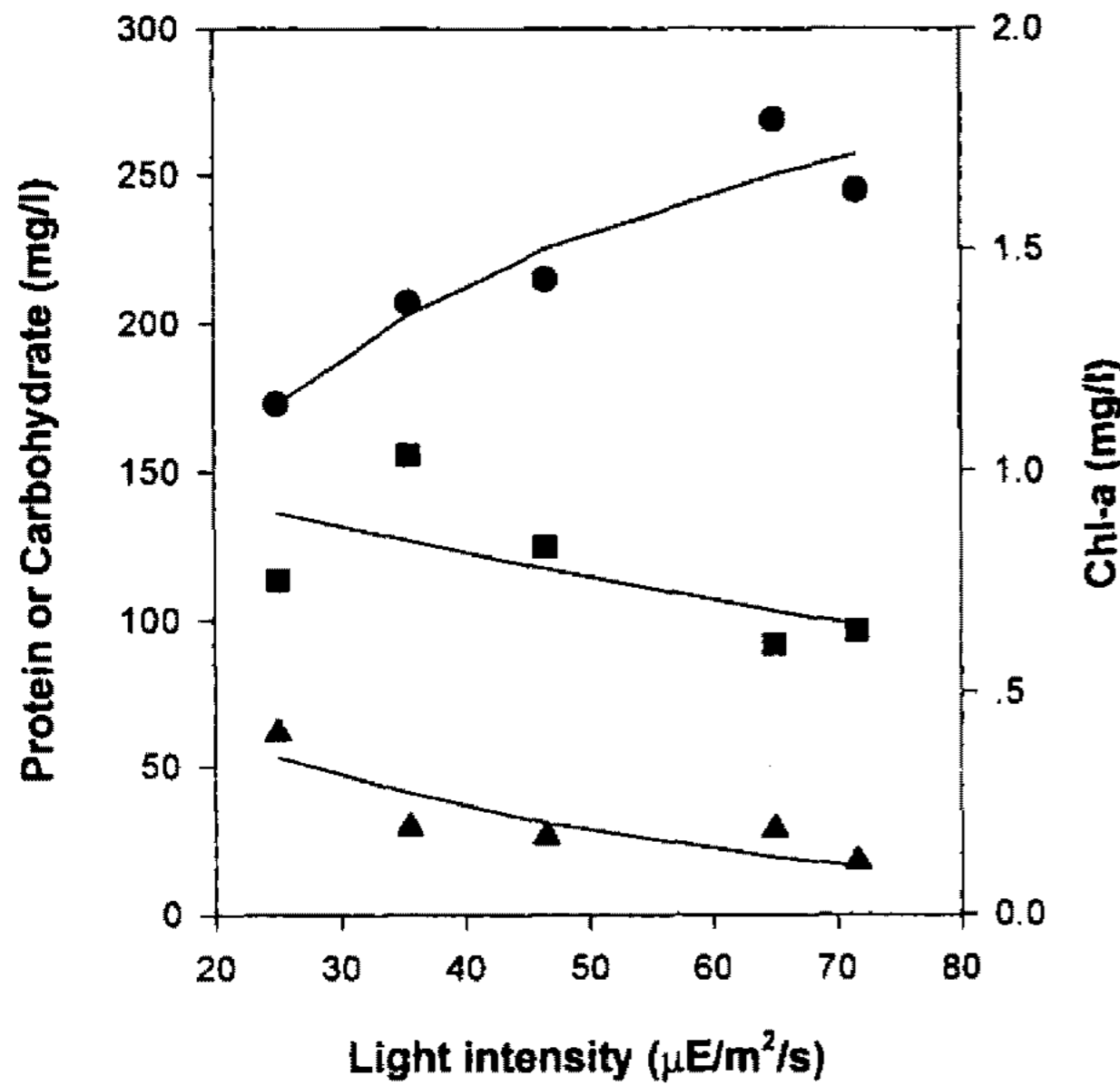


Fig. 3. Changes of protein (●), carbohydrate (■), and chl-*a* (▲) concentration as a function of light intensity in the culture of *B. braunii* UTEX 572. The real line is the result of curve fitting of each plot.

25일 이후에 엽록소 *a* 농도의 급격한 감소에 의한 결과로 판단된다. 자연계에서 분리한 미세조류의 최대 광합성률이 2.95-6.17 g C/g Chl/h로 조사된 보고(8)를 고려할 때 *B. braunii* UTEX 572의 광합성률이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있다.

광도에 따른 세포 구성성분의 변화

각기 다른 광도에서 *B. braunii* UTEX 572를 20일 동안 배양하였을 때 광도에 따른 세포 구성성분의 변화는 Fig. 3과 같다. 광도의 증가에 따라 단백질 농도는 증가하는 경향을 보였으며, 72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 245 mg/l로 건량의 37%를 차지하였다. 반면에 탄수화물 농도는 광도의 증가에 따라 감소하였으며, 72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광도에서 96 mg/l로 건량의 15%를 차지하였다. 이러한 결과는 유사한 배양조건에서 단백질과 탄수화물의 백분율이 22%와 14%로 조사된 보고(22)와 비교할 때 단백질 농도가 다소 높은 것으로 판단된다. 엽록소 *a* 농도는 광도 증가에 따라 감소하는 일반적인 경향을 따른 것으로 변화의 양상은 $y=0.670e^{-0.0254x}$ 의 지수함수로 표현되었다. 해양 미세조류인 *Isochrysis galbana*와 *Thalassiosira pseudonana*는 광도의 증가에 따라 단백질 함량이 일부 증가하였으나, *Chaetoceros calcitrans*는 별다른 변화가 없었다(7). 따라서 광도에 따른 단백질 함량의 변화는 조류 종(species)에 따라 다른 것으로 추정된다.

각기 다른 광도에서 *B. braunii* UTEX 572를 20일 동안 배양하였을 때 광도에 따른 세포내 총질소와 총인 함량은 Fig. 4와 같다. 광도의 증가에 단위 건량당 총질소와

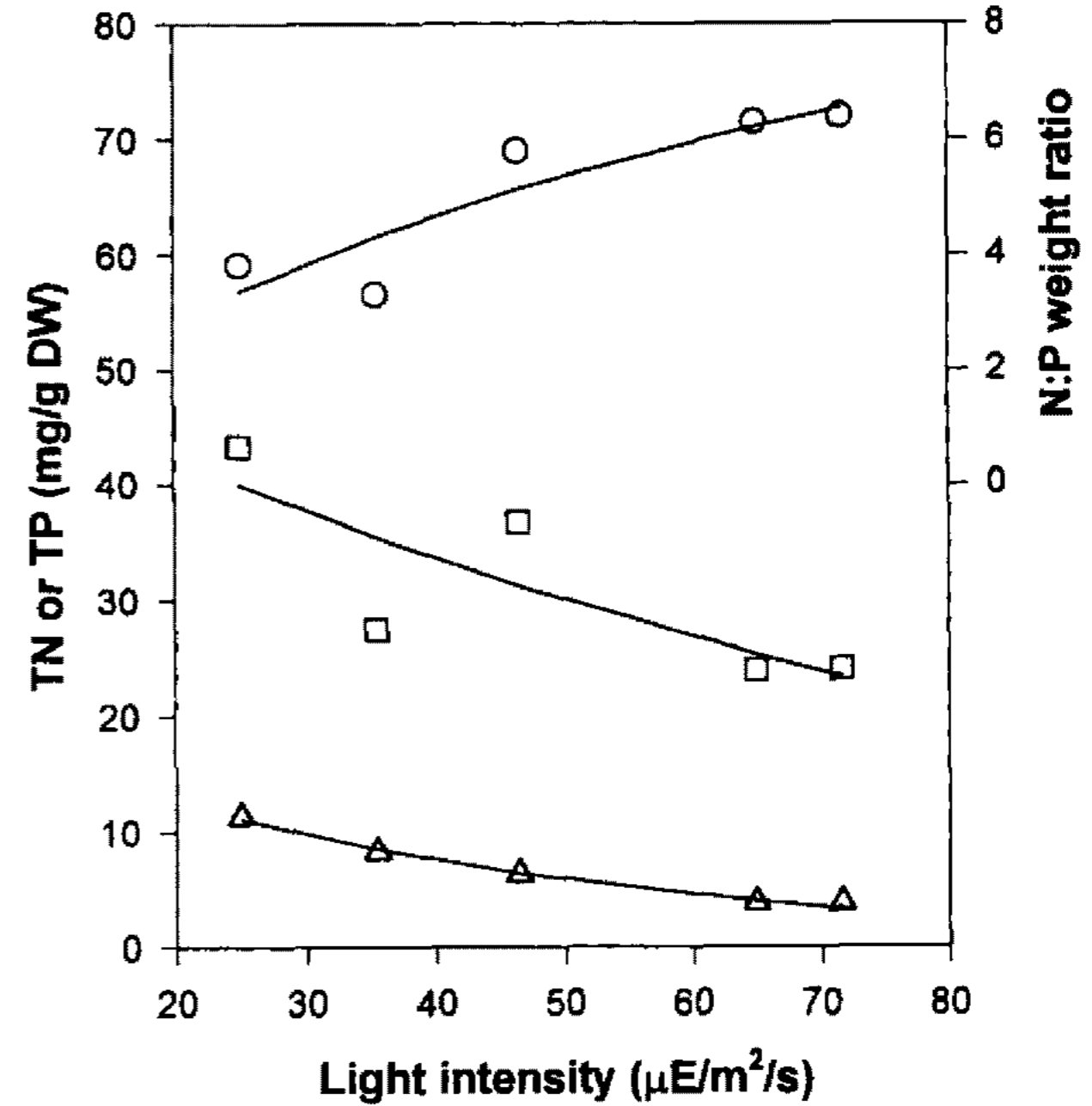


Fig. 4. Changes of total nitrogen (TN, □), total phosphorus (TP, ▲), and N:P weight ratio (○) as a function of light intensity in the culture of *B. braunii* UTEX 572. The real line is the result of curve fitting of each plot.

총인은 감소 경향을 보였으며, N:P ratio는 3.3에서 6.4로 점차적으로 증가하였다. 자연계에서 미세조류의 N:P ratio는 질량비로 평균 7:1임(23)을 고려할 때, *B. braunii* UTEX 572의 세포내 인 함량이 비교적 높은 것으로 판단되었다. 결과적으로 광도의 증가에 따라 탄수화물 농도, 엽록소 *a* 농도, 세포의 총질소와 총인 함량은 감소하는 반면 단백질 농도와 세포내 N:P ratio는 증가하였다. 이와 관련된 연구로 *Scenedesmus* sp.와 *Fragilaria* sp.는 영양염류가 충분한 조건에서 광도 증가에 따라 세포의 C, N, P 함량과 엽록소 *a* 함량은 감소하였다(6).

Botryococcus sp.의 생장에 미치는 pH와 N:P ratio

Chu 13 배지의 pH에 따른 *B. braunii* UTEX 572의 건량 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. Chu 13 배지에 KOH를 가하여 pH를 7.5로부터 8.0으로 조절한 경우 배양 35일에 건량은 2.9 g/l로 가장 높았다. 이때 건량증가율은 83 mg/l/d로 pH 7.0에서의 건량증가율 64 mg/l/d의 약 1.3배에 해당하는 것이다. 실제로 자연계에서 대규모로 발생한 Darwin River Reservoir에서 *B. braunii* bloom의 경우 pH 7.5-8.5의 알칼리 조건에서 형성되었으며(9), 이외에도 자연상태에서 *B. braunii*의 bloom은 높은 pH를 나타내는 수계에서 종종 보고되었다(2).

배지의 N:P ratio가 *B. braunii* UTEX 572의 건량에 미치는 영향은 Fig. 6과 같다. 배지의 N:P ratio가 2:1에서 50:1로 증가하면서 건량은 점차 증가하였으나 120:1과는 큰 차이가 없었다. 즉, 질소원의 첨가에 의한 N:

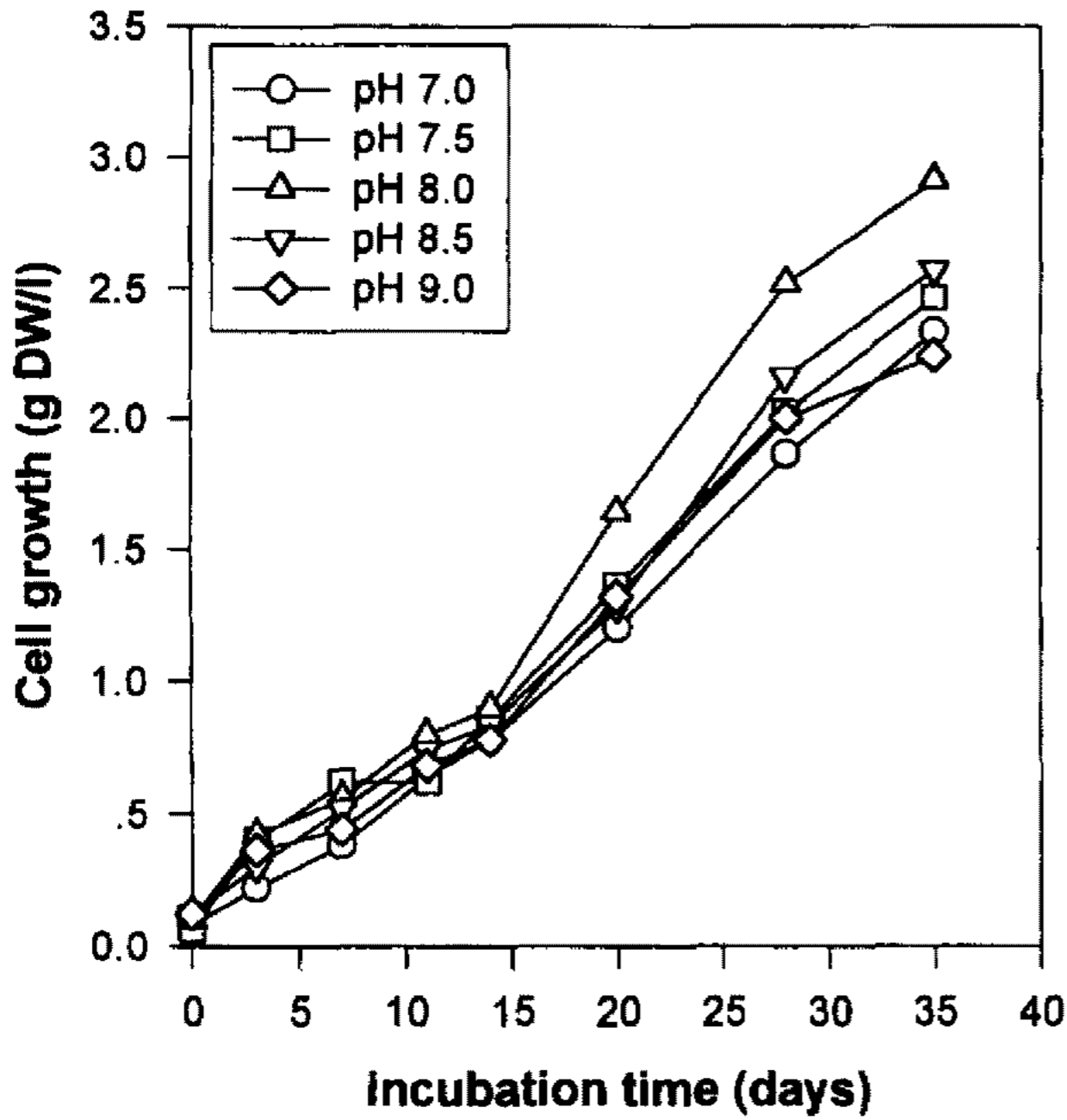


Fig. 5. Effect of initial pH on the cell growth of *B. braunii* UTEX 572 in Chu 13 medium.

P ratio는 50:1이 최적인 것으로 판단되었다. 배지의 N:P ratio가 50:1의 경우 배양 14일까지의 건량증가율은 65 mg/l/d에 그쳤으나, 배양 20일에서 배양 28일까지의 경우 115 mg/l/d로 조사된 배양기간 중에서 구간별 최대 건량증가율을 나타내었다. 따라서 건량증가율은 접종후 일정 기간이 경과하면서 *B. braunii* UTEX 572가 배지 및 주변환경에 적응한 후 최대에 달하는 것으로 판단되었다. *B. braunii*를 0.3% CO₂를 공급하면서 배지내 인의 농도를 1.8 mg/l로 일정하게 유지하고 질소의 농도를

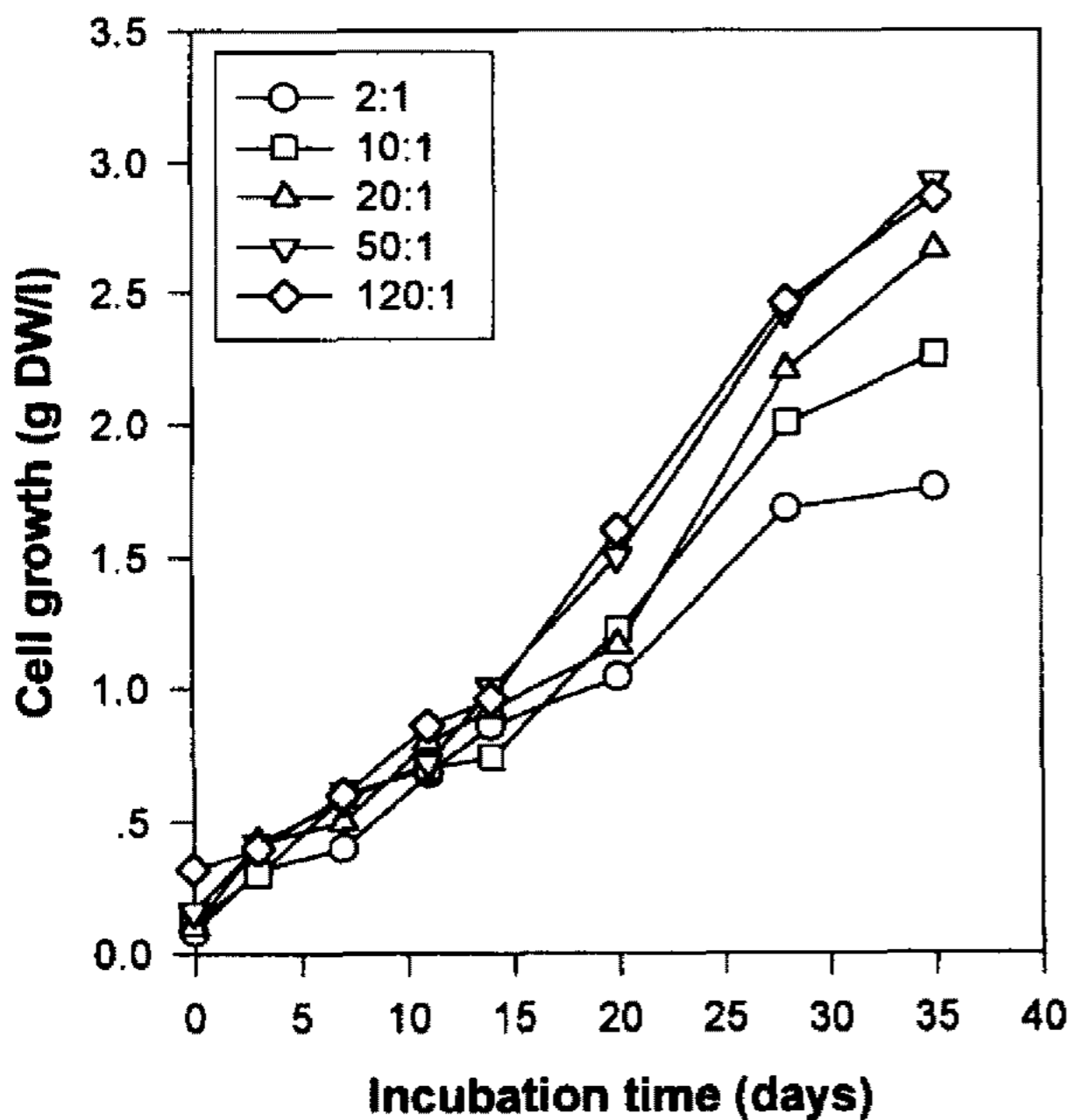


Fig. 6. Effect of N:P weight ratios on the cell growth of *B. braunii* UTEX 572 in Chu 13 medium.

11.9 mg/l에서 35.7 mg/l로 3배 증가시켜(N:P ratio는 20:1) 배양하였을 때, 건량은 배양 9일까지는 질소원의 추가에 의한 영향이 없었으나, 배양 21일에 3.7 g/l로 질소원을 추가하지 않은 경우에 비하여 약 1.5배의 증가를 보였다(24). 또한, Lupi 등(25)은 Chu 13 배지로 *B. braunii* UC 58을 배양하면서 질산염은 생장의 제한요인으로 작용하며, 15일 이상의 장기배양시 배지내 농도는 112 mg N/l이상을 권장한 바 있다. 따라서 장기배양시 배지내 질소원 농도가 건량 증가에 큰 영향을 주는 것으로 판단되었다. 본 연구에서 N:P ratio가 50:1인 경우 질소원의 농도는 736 mg/l로 이와 같은 농도는 35일간의 장기배양시에도 질소부족에 이르지 않는 농도로 판단된다.

한편, Chu 13 배지에서 *B. braunii*를 배양한 경우 인산염 농도는 배양초기 19 mg/l에서 배양 5일에는 거의 고갈되었으나, 이 이후에도 건량의 증가는 계속되었다(3). 즉, *B. braunii*는 세포내에 다량의 다중인산염(polyphosphate)을 저장하여 배지내에 인이 고갈된 상태에서도 세포생장이 당분간 계속되는 것으로 보인다. *B. braunii*의 비증식속도는 0.301 /d에서 초기 인산염의 농도를 1/100으로 희석한 경우 0.210 /d로 감소하여 배지내 인산염의 농도가 세포생장에 중요함을 보였다. 본 연구에서 인의 농도는 14.7 mg/l로 고정하였으므로 배양이 장기화하는 경우 인의 부족에 의한 성장 둔화를 고려할 수 있으며 향후 이에 대한 연구가 추가되어야 한다고 사료된다.

***B. braunii* UTEX 572의 open culture**

B. braunii UTEX 572의 open culture에서 Chu 13 배

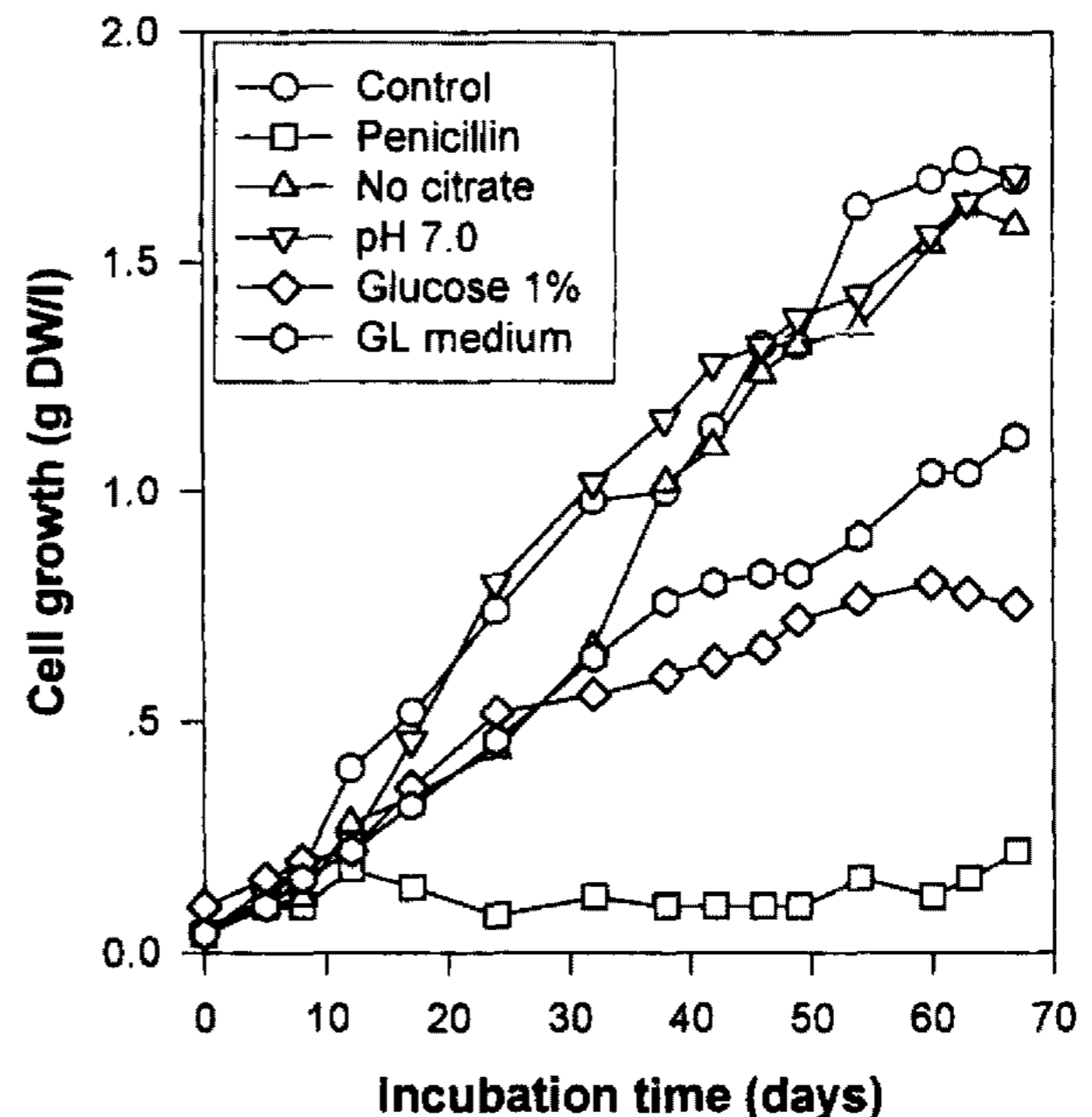


Fig. 7. Cell growth of *B. braunii* UTEX 572 in various culture media. Algal cultures were grown in 2-L Erlenmeyer flasks with an aeration of 300 ml/l/min.

지의 일부 조성변화 및 첨가물이 생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 전 배양기간에 걸쳐 Chu 13 배지를 사용한 대조구(Control)에서 세포생장이 가장 높았으며, Chu 13 배지에서 탄소원인 citric acid를 제외하고 ferric citrate를 동일 농도의 ferric chloride로 대체한 처리구(No citrate), pH를 7.0으로 조절한 처리구(pH 7.0)에서 세포생장은 대조구와 유사하였다. 그러나 항생제로서 penicillin 250 mg/l를 첨가한 처리구(Penicillin)나 glucose 1% 처리구(Glucose 1%)에서 세포생장이 크게 저해되었으며, GL 배지를 사용한 처리구(GL medium)에서도 세포생장은 낮았다. 특히 glucose 첨가는 탄소원으로 직접 이용하는 세균의 과잉번식에 의한 조류생장의 저해로 추정되었다.

본 연구에서 *B. braunii* UTEX 572의 건량증가율은 83-115 mg/l/d로 타 연구와 비교하여 큰 차이가 없었다(26, 27). 또한 특정 탄소원을 첨가하지 않은 상태에서 *B. braunii*의 generation time은 7일 정도로 보고되었으나(20, 26), 본 연구를 통하여 Chu 13 배지에서 배양 9일까지 generation time은 약 2.7일로 짧아 생장이 우수한 것으로 판단되었다.

요 약

B. braunii UTEX 572는 자연계에서 순수분리된 *Botryococcus* sp. GE 24에 비하여 25-72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 광조건에서 세포생장이 우수하였다. *B. braunii* UTEX 572의 비증식속도는 배양 1-9일에 Chu 13 배지에서 0.260 (1/day)로 가장 높았으며, 배양시간이 경과함에 따라 점차 감소하였다. 광도가 25-72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 범위로 조절된 상태에서 *B. braunii* UTEX 572는 광도의 증가에 따라 탄수화물 농도, 세포의 총질소와 총인 함량은 감소하지만 단백질 농도와 세포의 N:P ratio는 증가하였다. 엽록소 *a* 농도는 광도가 증가함에 따라 감소하는 일반적인 경향을 따랐다. Chu 13 배지의 초기 pH를 7.5로부터 8.0으로 조절한 경우 배양 35일까지의 건량증가율은 83 mg/l/d로 pH 7.0에서의 약 1.3배로 높았다. 배지의 N:P ratio가 50:1의 경우 배양 20일에서 배양 28일까지의 건량증가율은 115 mg/l/d로 조사된 배양기간 중에서 구간별 최대치를 나타내었다. *B. braunii* UTEX 572의 open culture시 Chu 13 배지를 사용한 대조구에서 세포생장이 가장 높았으며, pH 7.0 조절, penicillin 250 mg/l 첨가, glucose 1% 처리 등에 의하여 조류의 생장이 크게 억제되었다. 이것은 자연상태에서 *B. braunii* UTEX 572의 대량배양이 충분히 가능함을 보이는 결과이다.

참고문헌

1. Johansen, J. R., P. R. Lemke, W. R. Barclay and N. J.

- Nagle. 1987. Collection, screening and characterization of lipid producing microalgae: process during fiscal year 1987. SERI Report.
- Wake, L. V. and L. W. Hillen. 1980. Study of a "Bloom" of the oil-rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1637-1656.
- Casadevall, E., D. Dif, C. Largeau, C. Gudim, D. Chaumont and O. Desanti. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: Hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 286-295.
- Richmond, A. E. 1986. Microalgaculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* **4**: 369-438.
- Bailliez, C., C. Largeau, E. Casadevall, L. W. Yang and C. Berkaloff. 1988. Photosynthesis, growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized by entrapment and adsorption in polyurethane foams. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 141-147.
- Rhee, G-Y. and I. J. Gotham. 1981. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Light and the interactions of light with nitrate limitation. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 649-659.
- Harrison, P. J., P. A. Thompson and G., S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light on the biochemical composition of phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* **2**: 45-56.
- Oh, H.-M. and G-Y. Rhee. 1991. A comparative study of microalgae isolated from flooded rice paddies: light-limited growth, C fixation, growth efficiency and relative N and P requirement. *J. Appl. Phycol.* **3**: 211-220.
- Wolf, F. R. 1983. *Botryococcus braunii*: an unusual hydrocarbon-producing alga. *Appl. Biochem. Biotech.* **8**: 249-260.
- Oh, H.-M. and G-Y. Rhee. 1990. Preparation of unialgal cultures from natural waters by a micropipette technique. *Korean J. Phycol.* **5**: 131-136.
- Allen, M. M. 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* **4**: 1-4.
- Yamaguchi, K., H. Nakano, M. Murakami, S. Konosu, O. Nakayama, M. Kanda, A. Nakamura and H. Iwamoto. 1987. Lipid composition of a green alga, *Botryococcus braunii*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 493-498.
- APHA. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Menzel, D. W. and N. Corwin. 1965. The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fraction of persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.* **10**: 280-282.
- D'Elia, C. F., P. A. Steudler and N. Corwin. 1977. Determination of total nitrogen in aqueous samples using persulfate digestion. *Limnol. Oceanogr.* **22**: 760-764.
- Murphy, J. and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analyt. Chim. Acta* **27**: 31-36.

17. Wynne, D. and G-Y. Rhee. 1986. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plankton Res.* **8**: 91-103.
18. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
19. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. F. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
20. Bachofen, R. 1982. The production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* **38**: 47-49.
21. Vazquez-Duhalt, R. and H. Greppin. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry* **26**: 885-889.
22. Ben-Amotz, A., T. G. Tornabene and W. H. Thomas. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* **21**: 72-81.
23. Redfield, A. C. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* **46**: 205-221.
24. Wolf, F. R., A. M. Nonomura and J. A. Bassham. 1985. Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *J. Phycol.* **21**: 388-396.
25. Lupi, F. M., H. M. L. Fernandes, M. M. Tome, I. Sa-Correa and J. M. Novais. 1994. Influence of nitrogen source and photoperiod on exopolysaccharide synthesis by the microalga *Botryococcus braunii* UC 58. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 546-550.
26. Weetall, H. H. 1985. Studies on the nutritional requirements of the oil-producing alga *Botryococcus braunii*. *Appl. Biochem. Biotech.* **11**: 377-391.
27. Kosaric, N. and J. Velikonja. 1995. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 111-142.

(Received 10 April 1997)