

## 한국산 고지질 미세조류 *Botryococcus*의 분포 및 성장 특성

신상윤<sup>1,2</sup> · 조범호<sup>1</sup> · 이형관<sup>1</sup> · 오희목<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 환경바이오연구센터  
<sup>2</sup>과학기술연합대학원대학교 청정화학 및 생물학과

### Physiological and Ecological Characteristics of Lipid-Producing *Botryococcus* Isolated from the Korean Freshwaters

Sang-Yoon Shin<sup>1,2</sup>, Beom-Ho Jo<sup>1</sup>, Hyung-Gwan Lee<sup>1</sup> and Hee-Mock Oh<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of  
Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

<sup>2</sup>Green Chemistry and Environmental Biotechnology, University of Science and Technology (UST),  
Daejeon 303-333, Korea

**Abstract** - Recently, sustainable production of biofuel using algal biomass is being pursued because of its enormous potential. First and foremost, securing superior strains to develop an efficient production system for algal biodiesel through screening or genetic improvement of microalgae is necessary. The genus of *Botryococcus* is regarded as one of the superior microalgae for biodiesel production due to its ability to accumulate high amounts of lipids and hydrocarbons. However, its low growth rate is a bottleneck for large-scale production and commercialization. The purpose of this study is to obtain indigenous *Botryococcus* strains which possess high lipid content and biomass productivity. The *Botryococcus* sp. was isolated from the Seobu Reservoir in Jeju Island and identified as *Botryococcus sudeticus* J2 by comparative analysis of 18s rRNA gene and ITS regions. The biomass productivity and lipid content of *B. sudeticus* J2 were 0.116 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and 40.1% of dry wt., respectively. This was higher than the value of *B. braunii* UTEX 572, which is widely regarded as a superior strain among *Botryococcus* species. The relatively high growth rate of *B. sudeticus* J2 was achieved under a light intensity of 240 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with ambient air sparging when compared to 120 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with 2% CO<sub>2</sub> supply. In summary, it is likely that the isolated *B. sudeticus* J2 can be used for the mass cultivation and biodiesel production.

**Key words** : oleaginous microalga, *Botryococcus braunii*, *Botryococcus sudeticus*, distribution survey, physiological characteristics

## 서 론

인류가 화석에너지를 연료로 쓰기 시작한 이래로 그

사용량이 증가함에 따라 지구상에 존재하는 화석에너지 자원은 점차 고갈되어가고 있다. 따라서 현재 이를 대체할 수 있는 지속적이고 경제성 있는 대체에너지의 개발이 시급하다(Boyle 2004). 많은 대체에너지 중에서 수송용 연료를 대체하기 위해 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산이 최근 많은 관심을 받고 있다(Chisti 2007). 미

\* Corresponding author: Hee-Mock Oh, Tel. 042-860-4321,  
Fax. 042-879-8103, E-mail. heemock@kribb.re.kr

세조류는 광합성을 통해 수중의 이산화탄소를 이용하여 유기물을 합성하고 산소를 생산한다. 미세조류 바이오매스로부터 만들어지는 바이오디젤은 온실가스를 저감시키고, 지속 가능할 뿐만 아니라 식량자원과의 경쟁이 없으며 비 경작지에서도 배양이 가능한 장점을 가지고 있다. 또한 육상식물에 비해 단위면적당 바이오매스와 지질의 생산량이 월등히 높다(Mata *et al.* 2010). 즉, 미세조류를 이용한 바이오디젤의 생산성과 경제성은 적합한 조류주의 선택, 대량배양, 수확방법, 바이오디젤 전환 등에 의해 결정되며, 특히 조류의 성장률과 지질함량이 중요한 요인이 된다(Rodolfi *et al.* 2009).

미세조류로부터 바이오연료 생산에 있어서 녹조류에 속하며, 주로 호수, 저수지 등의 담수에서 발견되는 *Botryococcus* 속은 탄화수소와 지질의 함량이 월등히 높아 바이오디젤을 생산하기 위하여 적합한 조류로 인식되고 있다. 실제로, *Botryococcus braunii*의 대규모 수화(water bloom)가 1976년 호주의 Darwin River Reservoir에서 보고된 바 있다(Wake and Hillen 1980). *B. braunii*의 경우 건조중량 기준으로 75%까지 지질과 탄화수소를 축적하며(Meng *et al.* 2009), *Botryococcus sudeticus* UTEX 2629는 구성물인 triacylglycerol 중 oleic acid (C18:1 $\omega$ 9) 지방산의 함량이 높아 바이오디젤 생산이 유리하다고 보고되었다(Senousy *et al.* 2004). 따라서 1970년 전세계적인 석유판동 이후 미세조류로부터 바이오연료 생산을 위해 우량 *Botryococcus* 종의 탐색, 대량배양, 지질생산 등에 대한 많은 연구가 수행되었다(Sheehan *et al.* 1998).

본 연구에서는 미세조류 유래의 바이오디젤을 생산하는데 있어 후보 미세조류로서 *Botryococcus*를 활용하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다. 첫째, 육수학, 조류학 등 관련 전문학술지 문헌조사를 통하여 토착 *Botryococcus*의 국내 분포를 조사하였다. 둘째, 담수수계로부터 토착 *Botryococcus*를 순수 분리하였다. 셋째, 분리된 *B. sudeticus*의 생리적, 생태적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 국내 토착 *Botryococcus*의 분리

제주도의 담수환경에 서식하는 *Botryococcus*를 분리하기 위해 제주도 서부저수지에서 pore size 0.119 mm의 플랑크톤 네트를 이용해 시료를 채취하였다. 채집지의 수질 정보는 pH multimeter (WTW® Multi 3420, Germany)로 현장에서 측정하였으며, 총 질소 및 총 인 함량은 실험실에서 Standard Method를 이용하여 분석하였다(APHA

1998). 채취한 시료는 실험실에서 연속희석 후 평판도말하였고, 형성된 colony를 선별함으로써 단일 조류주를 분리하였다. 단일 종으로 분리된 조류주들은 중성지질을 특이적으로 염색시키는 Nile-Red (Sigma, USA)로 염색 후 형광현미경 (Nikon Eclipse 80i, Japan)으로 *Botryococcus*의 형태학적 근거 하에 세포 내 지질 함량이 높은 미세조류를 선별하였다(Lee *et al.* 1998).

### 2. 분리된 *Botryococcus* sp.의 분자적 동정

분리된 *Botryococcus*의 genomic DNA는 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)를 이용해 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 녹조류에 특이적인 18S rRNA gene과 Internal Transcribed Spacer (ITS) region을 각각의 primer set (18S rRNA gene forward primer 5'-CGA CTT CTG GAA GGG ACG TA-3', 18S rRNA gene reverse primer 5'-GAA TCA ACC TGA CAA GGC AAC-3', ITS1 primer 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', ITS4 primer 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3')을 이용해 증폭하였으며, 증폭된 DNA는 automatic DNA sequencer를 이용해 sequencing 하였다. Sequence 정보와 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 BLAST search program을 이용하여 *Botryococcus* sp.를 분자적으로 동정하였다.

### 3. *Botryococcus sudeticus* J2의 성장률과 총 지질함량 측정 및 비교

동정된 *B. sudeticus* J2는 비교를 위해 UTEX The Culture Collection of Algae 에서 분양 받은 고 지질 함량 미세조류인 *B. braunii* UTEX 572와 함께 1000 mL의 media bottle에 800 mL의 부피로 배양하였다. 배양은 BG-11배지 (Allen and Stanier 1968)를 이용해 120  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$ 의 광도에서 분당 0.25  $v v^{-1} m^{-1}$ 의 외기를 주입하고, 25  $\pm$  1°C의 항온·항습실에서 9일간 이루어졌다. 배양 기간 중 3일마다 각각의 처리구에서 시료를 분취하여 GF/C filter (Whatman, England)를 통해 여과하였고, 이를 105°C의 고온건조기에 4시간 이상 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다. 배양된 시료는 원심분리기 (Combi-514R, Hanil, Korea)로 4000 rpm으로 10분간 수확 후 동결건조하였고, Bligh and Dyer (1959)의 방법을 이용해 총 지질함량을 측정하였다.

### 4. *Botryococcus sudeticus* J2의 광합성 효율 측정

*B. sudeticus* J2의 광합성효율을 측정하기 위해 0, 35,

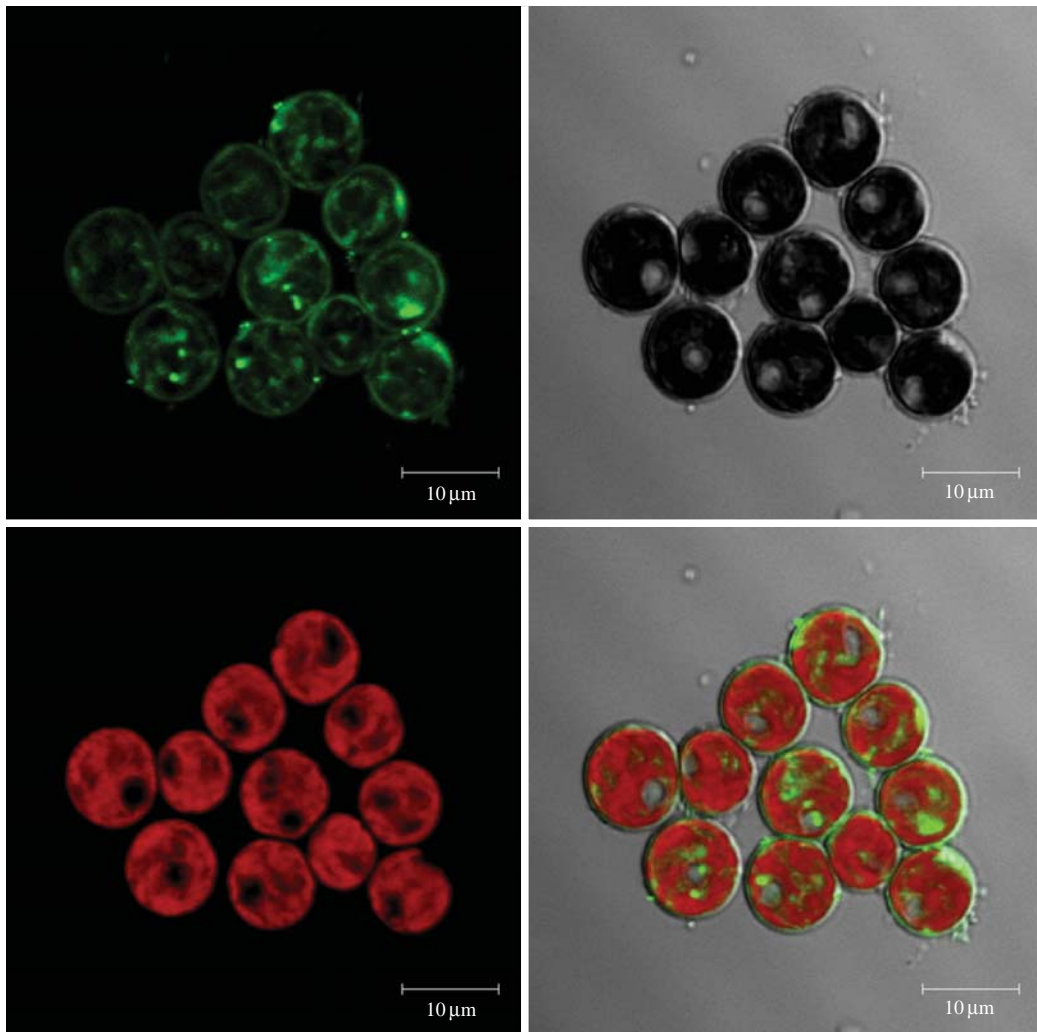
70, 100, 140, 235, 350, 410  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광도에  
서 광합성의 결과로 발생하는 산소량을 Oxygraph (Han-  
satech, England)로 측정하였다. 최대광합성률( $P_{\text{max}}$ ), 광합  
성효율( $\alpha$ ) 그리고 광포화시의 광도( $I_k$ )는 Ahn *et al.* (2002)  
의 P-I 곡선식을 이용하여 산출하였다.

### 5. *Botryococcus sudeticus* J2의 최적 배양을 위한 조건

*B. sudeticus* J2의 최적 배양을 시도하기 위해 앞서 실험  
했던 배양 조건을 대조구로 하였고, 대조구에서 각각  
2%의  $\text{CO}_2$ 를 넣어준 처리구와 대조구에서 광량을 240  
 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 조사하는 처리구를 대조구와 함  
께 배양하였다. 대조구와 처리구는 19일간 배양하였으  
며, 각 시료의 성장률과 총 지질 함량을 측정하였다.

### 6. *Botryococcus sudeticus* J2의 지방산 조성 분석

지방산 조성 분석은 MIDI Inc. (Newark, Del.)의 proto-  
col과 gas chromatography (GC-2010, Shimadzu, Koyto,  
Japan)를 이용해 분석하였다. Saponification을 위해 동결  
건조된 0.1 g의 시료에 reagent 1 (45 g sodium hydroxide,  
150 mL methanol, 150 mL 증류수) 1 mL을 섞어 100°C에서  
30분간 가열하였다. 가열한 tube를 냉각시킨 후 reagent  
2 (325 mL 6 N HCl, 275 mL methanol)을 2 mL 첨가하여  
methylation 하였고, reagent 3 (200 mL hexane, 200 mL  
methyl *tert*-butyl ether)을 1.25 mL 첨가하여 organic phase  
에 fatty acid methyl ester (FAME)를 추출하였다. Organic  
phase는 reagent 4 (10.8 g sodium hydroxide, 900 mL 증류  
수)로 세척한 후 C8~C24까지의 FAME 표준물질 (18918-



**Fig. 1.** Confocal microscope images of *B. sudeticus* J2. The red color is auto-fluorescence of chlorophylls and green color is fluorescence of stained lipid with 1  $\mu\text{M}$  BODIPY<sup>®</sup> 505/515 (D-3921, Invitrogen, USA).

1AMP, Supelco, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA)과 함께 gas chromatography 전개를 수행하여 각각의 지방산을 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 국내 토착 *Botryococcus*의 분리 및 분자적 동정

국내 담수에서 채취한 시료를 대상으로 *Botryococcus*의 분포를 광범위하게 조사하였으며, 2011년 가을 제주도 서부에 위치한 서부저수지(한경면 용수리)에서 *Botryococcus*의 존재를 확인하였다. 시료채취 구역의 pH는  $8.1 \pm 0.1$ , 총질소는  $2.26 \pm 0.02$  ppm, 총인은  $0.118 \pm 0.001$  ppm으로 조사되었다. 즉, 총인의 농도는 일반적으로 부영양화의 기준인 0.03 ppm을 크게 초과하여 부영양 수원으로 판단되었다(Heiskary and Walker 1987).

채취한 시료는 희석 후 BG-11 고체배지에 평판도말하여  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하였고, 나타난 colony들을 *Botryococcus*의 형태학적 특성에 근거하여 관찰함으로써 *Botryococcus* sp.를 분리하였다(Fig. 1). 분리된 *Botryococcus* sp.는 직경  $9.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$ 의 둥근 형태의 세포로 10~25개의 세포가 무정형의 군체를 형성하였으며, 각각의 세포는 이전에 분리된 *B. sudeticus* UTEX 2629 ( $4 \mu\text{m} \sim 20 \mu\text{m}$ )와 비슷한 형태와 크기를 보였다(Senousy et al. 2004).

분리된 *Botryococcus* sp.의 18s rRNA gene과 ITS region의 sequence를 BLAST search한 결과 *B. sudeticus* UTEX 2629 (GenBank accession No. AJ581914.1)와 각각 100%,

**Table 1.** Phylogenetic analysis of isolated *Botryococcus* in this study by using sequence similarity analysis within 18S rRNA gene and ITS region

| Primers for identification | Closest relative                  | Similarity (%) |
|----------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 18S rRNA gene              | <i>Botryococcus</i> sp. UTEX 2629 | 100            |
| ITS region                 | <i>Botryococcus</i> sp. UTEX 2629 | 96             |

96%의 상동성을 보여(Table 1), 분리된 *Botryococcus* sp.는 *Botryococcus sudeticus* J2로 명명하였다.

### 2. *Botryococcus* 속의 국내 분포 및 특성

국내에 서식하는 *Botryococcus* 속의 분포를 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 관련 문헌조사 결과 1989년 경상북도 경주 보문호에서 처음으로 *B. braunii*가 보고되었고(Kim et al. 1991), 2006년 경상남도 함안군 법수늪에서 또 한차례의 *B. braunii*가 보고되었다(Kim 2008). 이 후 2010년 5종의 *B. braunii*가 분리, 동정되었다(Lee et al. 2012). 국내에서 *Botryococcus* 속은 그 보고가 드물었으며, 보고된 *Botryococcus* 속 또한 모두 *braunii*종이었다. 따라서 이번 연구에서 분리된 *B. sudeticus* J2는 국내에서는 처음 보고되는 종으로 그 희소성과 생물학적 자원으로써의 가치가 있다고 판단된다.

한편, 1976년 호주에서 발생한 *B. braunii*의 수화(water bloom)는 연평균 기온이  $30^\circ\text{C}$  이상을 웃도는 적도부근의 Darwin지역에서 발생하였다(Wake and Hillen 1980). *B. braunii*는 세계각지의 호수, 못 등에 분포하는 것으로 보고되었다(Jeong 1993). 이러한 사실을 종합하여 볼 때 *Botryococcus* 속은 수계에 광범위하게 분포하지만, 많은 일사량, 높은 수온, 풍부한 영양염류의 조건에서 더욱 번성하는 미세조류 종으로 사료된다.

### 3. *Botryococcus sudeticus* J2의 성장률과 광합성효율

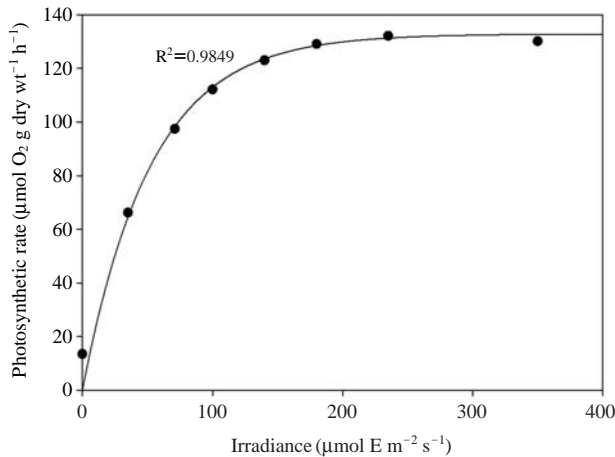
*B. sudeticus* J2와 *B. braunii* UTEX 572의 성장률을 측정된 결과, 비성장률(Specific growth rate,  $\mu$ )은 각각 0.29,  $0.17 \text{ day}^{-1}$ , 배가시간(Doubling time)은 2.39, 4.08 day로서 *B. sudeticus* J2의 성장률이 *B. braunii* UTEX 572에 비하여 매우 우수한 것을 확인하였고, *B. sudeticus* J2의 바이오매스 생산성(Biomass productivity)은  $0.116 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 을 보였다(Table 3). 그러나 이는 미세조류가 가지는 평균 성장률에 비해 낮은 편이고, 이러한 문제는 바이오디젤의 안정적인 생산에 영향을 줄 수 있다. 이를 극복하

**Table 2.** The literature survey on identified *Botryococcus* genus in Korean freshwater environment

| Species             | Appearance site                      | Date     | References      |
|---------------------|--------------------------------------|----------|-----------------|
| <i>B. braunii</i>   | Pomun Lake, Gyeongsangbuk-do         | 1989. 07 | Kim et al. 1991 |
| <i>B. braunii</i>   | Beopsu Marsh, Gyeongsangnam-do       | 2008. 04 | Kim 2008        |
| <i>B. braunii</i>   | Dorongyi Pond, Gangwon-do            | 2010. 04 | Lee et al. 2012 |
| <i>B. braunii</i>   | Matteul Pond, Gyeongsangbuk-do       | 2010. 04 | Lee et al. 2012 |
| <i>B. braunii</i>   | Sumeunmulbaengdui Swamp, Jeju-do     | 2010. 09 | Lee et al. 2012 |
| <i>B. braunii</i>   | Gwangryeong Pond, Jeju-do            | 2011. 04 | Lee et al. 2012 |
| <i>B. braunii</i>   | Guryoung Reservoir, Gyeongsangbuk-do | 2011. 04 | Lee et al. 2012 |
| <i>B. sudeticus</i> | Seobu Reservoir, Jeju-do             | -        | This study      |

**Table 3.** Comparison of growth characteristics and biomass productivity between *B. sudeticus* J2 and *B. braunii* UTEX 572

| Strains                    | Specific growth rate, $\mu$ (day <sup>-1</sup> ) | Doubling time (day) | Biomass productivity (g L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|--|---------------------|---|
| <i>B. sudeticus</i> J2     | 0.29   | 2.39                | 0.116   |
| <i>B. braunii</i> UTEX 572 | 0.17   | 4.08                | 0.048   |

**Fig. 2.** P-I (photosynthesis-irradiance) curve of *B. sudeticus* J2. Each point represents O<sub>2</sub> evolution rate at each irradiance.

기 위해서는 추후에 배양 조건 최적화나 분자생물학적 육종을 통해 생산성을 증가시킬 필요성이 있다.

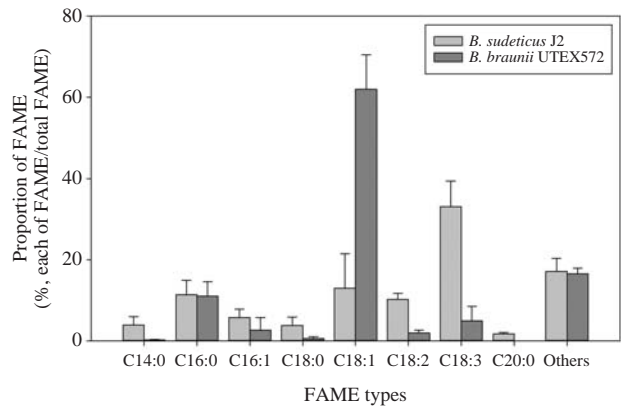
*B. sudeticus* J2의 광합성효율 측정을 위해 9일간 배양된 시료를 0, 35, 70, 100, 140, 235, 350, 410  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 8개의 광도에서 광합성에 의한 산소 발생량을 측정하였고, 이를 바탕으로 P-I (photosynthesis-irradiance) curve를 작성하였다 (Fig. 2). *B. sudeticus*의 최대광합성량 ( $P_{\text{max}}$ )은  $132.8 \mu\text{mol O}_2 \text{ g dry wt.}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 광합성효율 ( $\alpha$ )은  $2.5 \mu\text{mol O}_2 \text{ g dry wt.}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$ , 광포화점에서 광도 ( $I_k$ )는  $52.6 \mu\text{mol E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 였다. 이러한 결과는 *B. braunii*를 8~12일간 배양한 후 측정된 광합성효율이 42~207  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g dry wt.}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 조사된 보고 (Baillez *et al.* 1986)와 유사한 수준이었다.

#### 4. *Botryococcus sudeticus* J2의 총지질함량 및 지방산 조성

*B. sudeticus* J2와 *B. braunii* UTEX 572의 지질함량 (Lipid content) 및 지질생산성 (Lipid productivity)을 비교 분석하였다 (Table 4). 9일 배양된 *B. sudeticus* J2와 *B. braunii* UTEX 572는 각기 건조중량 대비 40.1%와 36.7%

**Table 4.** Comparison of lipid content and productivity between *B. sudeticus* J2 and *B. braunii* UTEX 572

| Strains                    | Lipid content (% of dry wt.) | Lipid productivity (mg L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|------------------------------|--|
| <i>B. sudeticus</i> J2     | 40.1                         | 46.5   |
| <i>B. braunii</i> UTEX 572 | 36.7                         | 17.6   |

**Fig. 3.** Fatty acid methyl ester (FAME) profile of *B. sudeticus* J2 and *B. braunii* UTEX 572.

의 지질함량을 보여 *B. sudeticus* J2의 지질함량이 다소 우세하였다. 미세조류의 지질생산성은 바이오매스 생산성과 지질함량에 의하여 결정된다. 따라서 *B. sudeticus* J2의 지질생산성은  $46.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로서, *B. braunii* UTEX 572의 지질생산성  $17.6 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 보다 약 2.5배 이상 높은 것으로 조사되었다. 최근 보고에 의하면 담수조류의 경우 CO<sub>2</sub>의 공급하에  $30.4 \sim 53.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 지질생산성을 보였으며 (Rodolfi *et al.* 2009) 보고 중 지질함량이 가장 높은 종이 21.1%인 것을 고려해 볼 때 *B. sudeticus* J2는 바이오디젤 생산을 위한 조류주로서 가치가 있다.

*B. sudeticus* J2의 지방산의 종류와 함량을 분석한 결과 FAME 형태의 Myristate (C14:0)는 3.9%, Palmitate (C16:0)는 11.4%, Palmitoleate (C16:1)는 5.7%, Stearate (C18:0)는 3.8%, Oleate (C18:1)는 13.0%, Linoleate (C18:2)는 10.2%, Linolenate (C18:3)는 33.0%, 그리고 Arachidate (C20:0)는 1.8%로 조사되었다 (Fig. 3). 즉, *B. sudeticus* J2는 C18:2, C18:3의 불포화도가 높은 지방산이 다량으로 존재하였다. 반면에 *B. braunii* UTEX 572의 지방산 조성은 C18:1의 단일불포화지방산이 70% 정도 다량으로 함유되었으므로, 전환공정을 통해 바이오디젤을 생산하기에는 보다 유리한 것으로 판단된다.

5. *Botryococcus sudeticus* J2의 최적배양 조건

*B. sudeticus* J2 최적 생장조건을 구하기 대조구(외기, 120 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), 2% CO<sub>2</sub> 처리구, 광도 2배 처리구(240 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)에서 19일간 배양하면서 생장을 조사하였다(Fig. 4). 건조중량은 배양 19일 동안 대조구와 처리구 모두 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 광도 2배 처리구에서 생장이 가장 높았고, CO<sub>2</sub> 처리구에서는 생장이 일부 저해되었다. 즉, 배양 19일에 *B. sudeticus* J2의 건조중량은 대조구, 2% CO<sub>2</sub> 처리구, 광도 2배 처리구에서 각각 2.56, 2.14, 4.11 g L<sup>-1</sup>였다. 대조구, 2% CO<sub>2</sub> 처리구, 광도 2배 처리구에서 *B. sudeticus* J2의 바이오매스 생산성은 각각 0.129, 0.107, 0.211 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>였고, 지질생산성은 33.6 24.6 52.1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>였다(Table 5). 즉, 광도가 2배 증가함에 따라 *B. sudeticus* J2의 바이오매스 생산성은 약 1.5배 증가되었다.

보고에 따르면 *B. braunii*의 경우 2% CO<sub>2</sub>를 주입하며 배양했을 때 대조구에 비해 바이오매스가 1.5배 이상 증

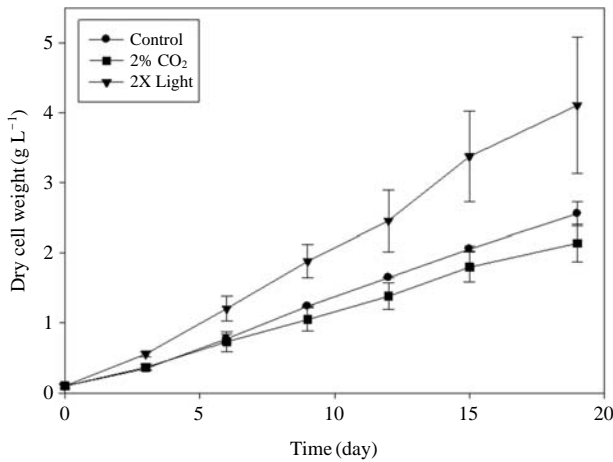


Fig. 4. Growth curves of *B. sudeticus* J2 culture under ambient air with 120 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity (●), 2% CO<sub>2</sub> with 120 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity (■) and ambient air with 240 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light intensity (▼).

Table 5. Biomass productivity, lipid content and lipid productivity of *B. sudeticus* J2 under different culture conditions for characterization

| Culture conditions   | Biomass productivity (g L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) | Lipid content (% of dry wt.) | Lipid productivity (mg L <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) |
|--|---|------------------------------|--|
| Control  | 0.129   | 25.9                         | 33.6   |
| 2% CO <sub>2</sub>   | 0.107   | 22.9                         | 24.6   |
| 2X light intensity (240 μmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | 0.211   | 24.7                         | 52.1   |

가하였는데 (Rao et al. 2007), *B. sudeticus* J2는 CO<sub>2</sub>를 주입해준 처리구에서는 대조구와 비교해 생장률이 낮았다. 이는 *B. sudeticus* J2가 분리된 채집지의 pH가 8.1±0.1인 것을 고려했을 때, CO<sub>2</sub>의 지속적인 주입으로 배지 내의 pH가 낮아져 그 영향이 생장에 저해요소가 되었다고 사료된다. 반면 2배의 광량을 준 처리구에서는 대조구보다 생장률이 높았으며 이는 *Botryococcus* 속이 대부분 일사량이 높은 지역이나 시기에 보고되는 것으로 보아 높은 광량에서도 안정적인 생장이 가능한 것이라 사료된다. 이러한 특징은 광도가 높은 자연광에서 미세조류의 옥외배양을 시도할 때 발생할 수 있는 광저해 (photoinhibition)를 회피할 수 있는 좋은 특징 (Tredici et al. 1991)이 될 수 있으므로 다양한 광 조건에서의 *Botryococcus* 속의 생장과 관련된 연구가 수행되어야 한다.

적 요

한국산 고지질 *Botryococcus*를 확보하기 위해 시료채취를 하였고, 실험실에서 *Botryococcus* sp.를 분리하였다. 분리된 *Botryococcus* sp.는 현미경으로 그 크기와 형태를 관찰하였고, 분자적 동정을 위해 18S rRNA gene과 ITS region의 염기서열을 분석함으로써 *Botryococcus sudeticus* J2로 명명하였으며, 생태학적 특성 연구를 위해 문헌조사를 통해 국내의 *Botryococcus* 속의 분포를 조사를 실시하였다. 동정된 *B. sudeticus* J2의 생리적 특성 분석을 위해 배양실험을 수행하였고, 생장률과 바이오매스 생산성 그리고 광합성효율을 측정하였다. 또한 바이오디젤 생산을 위한 조류주로서의 가치를 판단하기 위해 총 지질 함유량과 지방산 조성을 분석하였다. *B. sudeticus* J2의 생태적, 생리적 연구 후 2배의 광량과 2% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양을 수행함으로써 최적 배양조건을 탐색하고자 하였다. 분리된 *B. sudeticus* J2는 비교를 위한 *B. braunii* UTEX 572보다 높은 바이오매스 생산성과 지질생산성을 보였으나 바이오매스 생산을 위한 다른 후보 미세조류에 비해서는 낮은 생장률을 보였다. 따라서 바이오디젤 생산을 위한 조류로 *B. sudeticus* J2를 활용하기 위해서는 본 연구에서 밝혀진 광저해에 대한 내성에 초점을 맞추어 최적 배양을 위한 광조건을 탐색하는 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 글로벌프런티어사업 (Advanced Biomass R&D Center)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Ahn CY, HS Kim, BD Yoon and HM Oh. 2002. Photosynthetic characteristics and cell quota of nitrogen and phosphorus in *Scenedesmus quadricauda* under P limitation. *Algae* 17: 83-87.
- Allen MM and RY Stanier. 1968. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* 51:199-202.
- APHA (American Public Health Association). 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Baillez C, C Largeau, C Berkaloff and E Casadevall. 1986. Immobilization of *Botryococcus braunii* in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:361-366.
- Bligh EG and WJ Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Boyle G. 2004. *Renewable Energy*. Oxford Univ. Press, UK.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
- Heiskary S and WW Walker. 1987. Developing phosphorus criteria for Minnesota lakes. *Lake Reserv. Manage.* 4:1-9.
- Jeong J. 1993. *Illustration of the Freshwater Algae of Korea*. Academy Publishing Co., Seoul.
- Kim MK. 2008. Patterns in phytoplankton community structure in the Beopsu Marsh, Haman-gun, Gyeongsangnam-do, Korea. *Algae* 23:219-230.
- Kim YJ, JS Kim and J Chung. 1991. Seasonal variation of phytoplankton in Tokdong and Pomun Lakes. *Korean J. Limnol.* 24:251-263.
- Lee SH, CH Lee, BH Jo, CY Ahn, HS Kim and HM Oh. 2012. Isolation and phylogenetic analysis of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) from Korean freshwaters. *Korean J. Environ. Biol.* 30:31-38.
- Lee SJ, BD Yoon and HM Oh. 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* 12:553-556.
- Mata TM, AA Martins and NS Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14:217-232.
- Meng X, J Yang, X Xu, L Zhang, Q Nie and M Xian. 2009. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energ.* 34:1-5.
- Rao R, R Sarada and GA Ravishankar. 2007. Influence of CO<sub>2</sub> on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:414-419.
- Rodolfi L, CZ Graziella, B Niccolo, P Giulia, B Natascia, B Gimena and RT Mario. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102:100-112.
- Senousy HH, WB Gordon and H Ethan. 2004. Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolated UTEX 2629 (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 40:412-423.
- Sheehan J, T Dunahay, J Benemann and P Roessler. 1998. *A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae*. Golden: National Renewable Energy Laboratory.
- Tredici MR, P Carozzi, GC Zittelli and R Materassi. 1991. A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 38: 153-159.
- Wake LV and LW Hillen. 1980. Study of a "bloom" of the oil rich alga *Botryococcus braunii* in the Darwin River Reservoir. *Biotechnol. Bioeng.* 22:1637-1656.

Received: 10 September 2013

Revised: 13 October 2013

Revision accepted: 17 October 2013