

## Tubular Bioreactor에서 *Botryococcus braunii*를 이용한 축산폐수의 고도처리

이석준 · 김희식 · 윤병대 · 오희목\*  
생명공학연구소 환경미생물RU

**Advanced Treatment of Swine Wastewater by *Botryococcus braunii* in a Tubular Bioreactor.**  
Lee, Seog June, Hee-Sik Kim, Byung-Dae Yoon, and Hee-Mock Oh\*. *Environmental Microbiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea* - This study was conducted to investigate the production of lipid, and removal of nitrogen and phosphorus from swine wastewater by *Botryococcus braunii* UTEX 572 in a tubular bioreactor. The rate of dry cell weight increase of *B. braunii* was highest at 20.1 mg/l/d in a modified Chu 13 medium at 25°C. Under the above conditions, the rate of lipid content increase was also highest at 6.1 mg/l/d. The lipid content of *B. braunii* on a dry weight basis ranged from 30.5 to 34.1% with an average value of 32.3%. When *B. braunii* was cultured in a secondary-treated swine wastewater diluted to 50% with tap water, the rate of dry cell weight increase was 18.6 mg/l/d and the rate of lipid content increase was 6.0 mg/l/d. The lipid content ranged from 30.3 to 34.2%. No significant difference was observed between lipid content and growth conditions. The removal rates of nitrogen and phosphorus in swine wastewater were 43.9% and 41.7%, respectively, after 14 days of incubation.

**Key words:** advanced treatment, *Botryococcus braunii*, lipid production, swine wastewater, tubular bioreactor

*Botryococcus braunii*는 단세포성 조류(algae)로 태양 에너지를 이용하여 이산화탄소와 물을 결합하여 저유황 디젤유로 전환 가능한 지질이나 triglycerides로 구성할 수 있는 특징이 있으므로, 고농도의 탄화수소를 함유한 조류주의 탐색, 저장지질의 성분분석, 배양법의 개발 등 [1, 3]에 관하여 많이 연구되어 왔다. *B. braunii*는 건조 중량의 15-76%가 탄화수소로 구성되어 있으며, 특히 질소원이 결핍된 상태에서 탄화수소의 함량이 증가하는 것으로 보고되었다[4, 22]. *B. braunii*는 terpenoid 경로를 거쳐 botryococenes( $C_{34}H_{58}$ )을 포함한 여러 종류의 탄화수소를 합성하는데 탄화수소 혼합물은 원유와 동일한 분별증류에 의하여 분류될 수 있다[20, 24]. 그러나 *B. braunii*는 자연계에서 생장속도가 매우 느리고 비성장이나 노화시기에 탄화수소의 축적함량이 높아지므로 아직까지 화석연료에 비하여 경제적 측면에서 비용이 많이 투입되는 어려움이 있다[2, 23].

미세조류의 대량배양을 위하여서는 탄소원으로 이용되는  $CO_2$ 를 적정량 공급하는 것이 필수적이며, 탄화수소의 합성효율을 극대화하기 위하여는 광도의 최적화, 온도조절, 혼합, 영양염류의 균형 있는 공급 등[15, 19]이 수반되어야 한다. 또한 생산비를 줄이기 위하여 옥외배양 보다 태양광을 이용할 수 있는 옥외배양이 바람직하며, 우리

나라와 같이 계절의 변화에 따라 온도와 광도의 차이가 심한 지역에서는 배양기의 표면에 보다 많은 양의 빛이 공급될 수 있게 설계된 관상생물반응기(tubular bioreactor)의 사용이 효율적일 것으로 판단된다. *B. braunii* 대량배양의 장점은 대체에너지 자원을 생산함과 동시에 전 세계적으로 문제시되고 있는  $CO_2$ 에 의한 지구온난화 현상을 생물학적으로 해결하기 위한 하나의 방법으로서 이용될 수 있으며, 대기오염의 상당부분을 차지하는 화력발전소 배출가스의 이산화탄소 농도를 저감하는 최선의 방법으로 미세조류의 대량배양이 제안된 바 있다[11, 12]. 또한, 미세조류의 대량배양은 배양액으로서 축산폐수를 이용할 경우 폐수처리과정에서 쉽게 제거되지 않는 질소와 인과 같은 영양염류의 농도를 현저히 감소시킬 수 있으므로 호소 부영양화의 해결에도 일익을 담당할 수 있다[7].

본 연구에서는 옥외에서 태양광에 의하여 조류의 성장이 이루어지도록 설계 제작한 관상생물반응기를 이용하여 축산폐수를 배양액으로 공급하면서 *B. braunii*를 대량 배양함으로써 biodiesel로 전환될 수 있는 지질의 생성 정도 및 축산폐수로부터 질소와 인의 제거효율을 측정하였으며, 개방반응기를 이용한 *B. braunii*의 연속배양 가능성에 대하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 미세조류

\*Corresponding author  
Tel. 82-42-860-4321, Fax. 82-42-860-4594  
E-mail: heemock@kribb4680.kribb.re.kr

미세조류 중에서 탄화수소함량이 높은 것으로 알려진 *Botryococcus braunii* UTEX 572를 The University of Texas at Austin로부터 분양 받아 사용하였으며, 미세조류의 보존 및 배양을 위하여 Chu 13 배지[10]를 사용하였다.

**축산폐수**

축산폐수의 고차처리를 위하여 충청남도 논산에 위치한 대규모 돼지 사육단지로부터 1차 물리적 처리, 2차 활성슬러지법으로 처리된 축산폐수를 공급받아 4℃의 저온실에 보관하면서 수도수와 혼합(1:1, v/v)하여 배양액으로 사용하였다. 축산폐수의 물리화학적 조성은 전보[18]에서 보고한 바와 같으며, 총질소(TN) 함량이 58.7 mg/l, 총인(TP) 함량이 14.7 mg/l로서 축산폐수 공동처리 시설의 방류수 수질기준인 총질소 60 mg/l에 근접하였으며, 총인 8 mg/l를 크게 초과하는 것으로 나타났다.

**미세조류의 biomass**

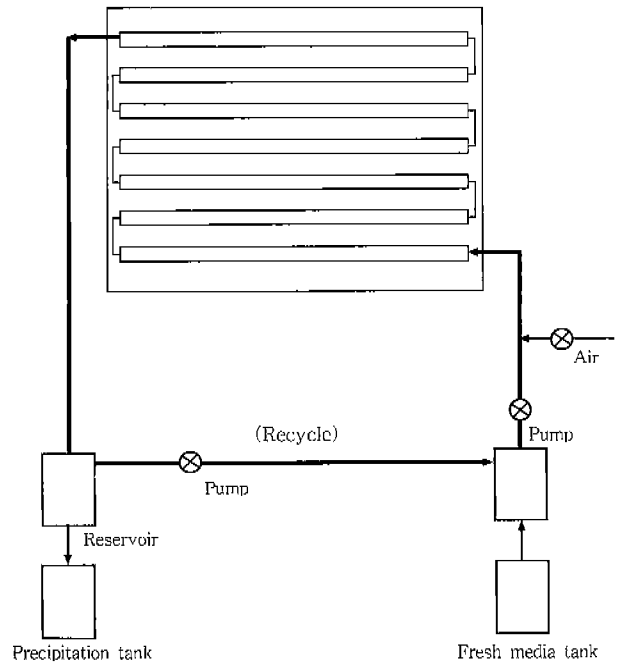
미세조류의 biomass는 건조세포중량 및 *in vivo* fluorescence에 의하여 산정하였다. 건조세포중량은 시료를 Whatman GF/C filter로 여과한 후 여과된 고형물을 100℃에서 12시간 건조하여 측정하였으며, *in vivo* fluorescence값은 Fluorometer(Tuner Model 450)로 측정하였다[9].

**총질소 및 총인의 분석**

축산폐수 배양액내에 존재하는 총질소와 총인의 함량은 persulfate방법[5]에 준하여 분석하였다. 조류배양액에 0.67% potassium persulfate를 첨가하고 고압멸균기를 이용하여 120℃에서 45분간 가열하여 질소와 인을 질산염과 인산염으로 산화시켰다. 산화된 시료에 0.3 N HCl을 가하여 혼합하고, 완충용액(3.0% boric acid, 2.0 N NaOH)과 증류수를 첨가하여 과황산염으로 산화처리하여 질산염과 정인산염의 형태로 변화시켰다. 질산염은 Szechrome NB 시약을 사용하여 발색시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였으며[25], 정인산염은 phosphomolybdate법[13]에 준하여 발색시킨 후 885 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다.

**지질의 분석**

*B. braunii*의 지질성분은 주로 oleic acid 및 palmitic acid로 구성되어 있고[26], 이들 두 지방산이 CO<sub>2</sub>로부터 탄화수소로의 생합성 과정에서 중요한 전구체이므로 [20], 전보[10]에서와 동일하게 탄화수소함량 대신에 지질함량을 측정하였으며, 미세조류의 세포내 지질함량은 Lee 등[9]의 방법에 준하여 분석하였다. 수확된 *B. braunii*는 Bead-beater(Biospec 3110)로 분쇄하고 분액



**Fig. 1. Schematic diagram of a tubular bioreactor for algal mass cultivation.**

여두를 이용하여 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합 용매로 추출하였다. 증류수를 첨가하여 chloroform:methanol:water의 비율이 1:1:0.9(v/v/v)가 되게 조절하여, 분리된 chloroform층을 5% NaCl용액으로 세정하여 불순물을 제거한 후 건조시켜 총지질 함량을 측정하였다.

**관상생물반응기 및 배양조건**

*B. braunii*의 대량배양을 위하여 50 L 규모의 관상생물반응기를 설계 제작하여 사용하였으며 모식도는 Fig. 1에 나타내었다. 배양액으로서는 Chu 13 또는 수도수로 50% 희석된 축산폐수(1:1, v/v)를 사용하였다. 광은 14 h(명)/10 h(암)의 주기로 자연광과 인공광을 조합하여 약 90 μE/m<sup>2</sup>/s으로 조사하였고, 공기는 0.8 vvm으로 공급하였다. Chu 13을 배양액으로 공급한 경우 1단계 14일, 2단계 7일, 3단계 14일간 연속하여 배양하였으며, 축산폐수를 배양액으로 사용한 경우 1, 2단계 각각 14일간 연속 배양하였다. 전자의 경우는 2, 3단계에서, 후자의 경우는 1, 2단계에서 50 ml/min의 CO<sub>2</sub>를 추가로 공급하였다. 각 단계별 배양기간이 경과된 후 *B. braunii*는 Lee 등[10]의 방법에 의하여 배양액으로부터 분리되었으며 새로운 배양액이 공급되었다.

**결과 및 고찰**

**Chu 13 배양액에서 지질 생산**

관상생물반응기를 이용하여 Chu 13 배지에서 *B. bra-*

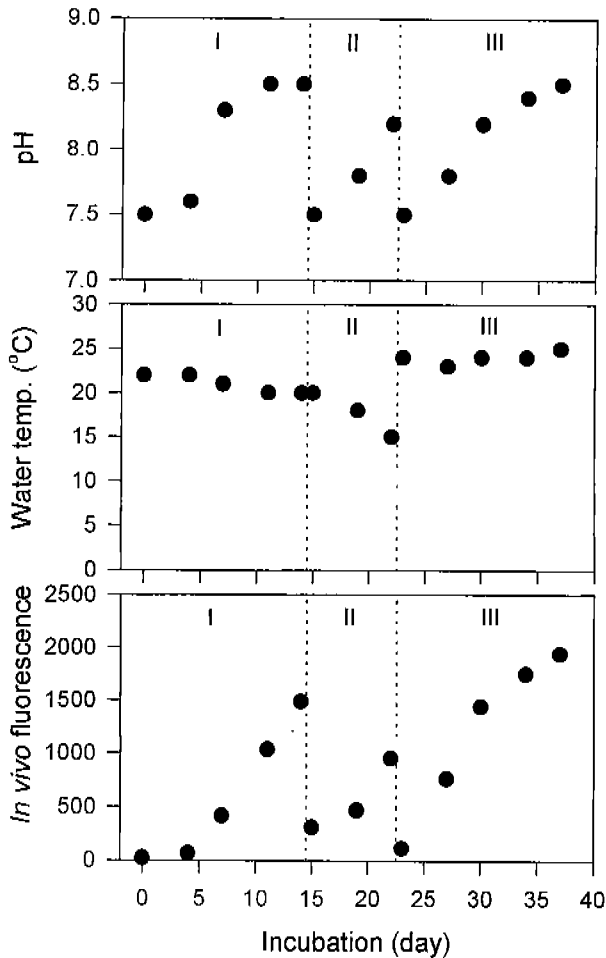


Fig. 2. Changes of pH, water temperature, and *in vivo* fluorescence during the cultivation of *Botryococcus braunii* UTEX 572 in a tubular bioreactor.

*unii*를 배양하였을 때 pH, 수온, *in vivo* fluorescence의 변화는 Fig. 2와 같다. 배양기간중 수온의 변화는 1단계에서 20-22°C를 유지하였으나, 2단계에서 외부의 기온하락에 따라 수온이 15°C로 강하함으로써 *B. braunii*의 생장이 둔화되는 것으로 나타나 3단계에서는 배양액의 온도를 25°C내외로 일정하게 유지하였다. 각 배양단계에서 조류의 성장에 따라 배양액의 pH는 초기의 7.5에서 8.5 정도로 증가하였다. 이와 같은 pH의 증가는 조류의 성장에 따른 일반적인 현상으로서 조류 대사산물의 분비에 의한 것으로 생각된다[10]. 조류 biomass의 간접지표로 사용되는 *in vivo* fluorescence의 변화는 1단계에서는 초기의 22에서 1487로 증가하였으나, 2단계에서는 CO<sub>2</sub>의 공급에도 불구하고 성장율이 둔화되는 것으로 나타났는데 이는 수온의 하강에 기인하는 것으로 생각된다. 3단계에서는 배양액의 온도를 25°C로 유지함으로써 빠른 성장속도를 나타내었다.

배양단계에 따른 *B. braunii*의 건조세포중량 및 지질

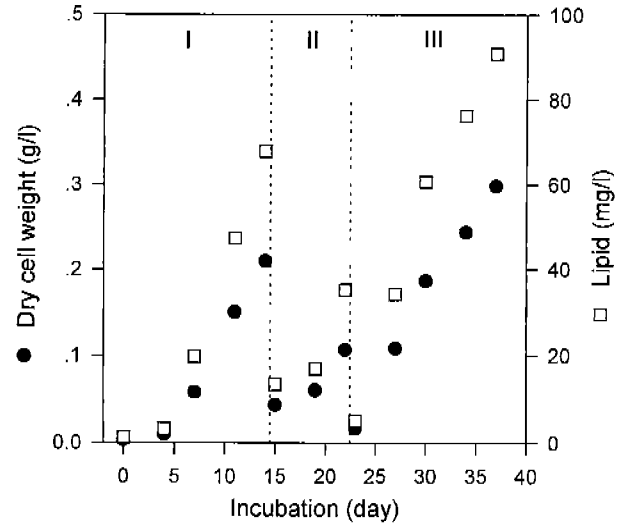


Fig. 3. Dry cell weight and lipid content of *Botryococcus braunii* UTEX 572 cultured in a tubular bioreactor.

함량의 변화는 Fig. 3과 같다. 건조세포중량의 변화는 *in vivo* fluorescence의 변화와 잘 일치하는 것으로 나타나 오 등[17]이 보고한 바와 같이 측정이 간편하고 신속한 *in vivo* fluorescence값을 조류 biomass의 지표로 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 배양단계별 평균 건조세포중량 증가율은 1단계 14.7 mg/l/d, 2단계 8.9 mg/l/d, 3단계 20.1 mg/l/d로 조사되었으며, 지질함량 증가율은 각각 4.8 mg/l/d, 3.1 mg/l/d, 6.1 mg/l/d로 나타났다. 따라서 배양액의 온도를 25°C로 유지시키고 50 ml/min의 CO<sub>2</sub>를 공기와 함께 공급함으로써 *B. braunii*의 평균 건조세포중량 증가율 및 지질함량 증가율을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다. 세포건조중량에 대한 지질의 함량은 모든 단계에서 30.5-34.2%로 큰 차이가 없는 것으로 나타나 *B. braunii*의 세포내 평균 지질함량은 배양 5주까지 큰 변화가 없으며 건조중량의 약 32% 정도라는 보고[10]와 일치하였다.

축산폐수 배양액에서 지질 생산 및 질소와 인의 제거

*B. braunii*의 대량배양을 통하여 지질 생산 및 축산폐수의 질소와 인을 동시에 제거할 목적으로 2차 처리된 축산폐수를 50% 희석한 후 배양액으로 공급하고 온도를 25°C로 유지한 조건에서 조류의 성장 및 질소와 인의 제거율을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 축산폐수를 배양액으로 공급하여 1단계로 14일간 배양하였을 때 평균 건조세포중량 증가율은 16.9 mg/l/d로 나타났으며, *B. braunii*의 수확 후 축산폐수를 추가로 공급한 2단계 배양시의 평균 건조세포중량 증가율은 18.6 mg/l/d로 1단계에 비하여 약간 증가하였다. 또한 지질함량 증가율은 1단계의 5.5 mg/l/d에서 2단계에는 6.0 mg/l/d로 증가하였으며, 건조세포중량에 대한 평균 지질함량은 1단계 및 2단계에

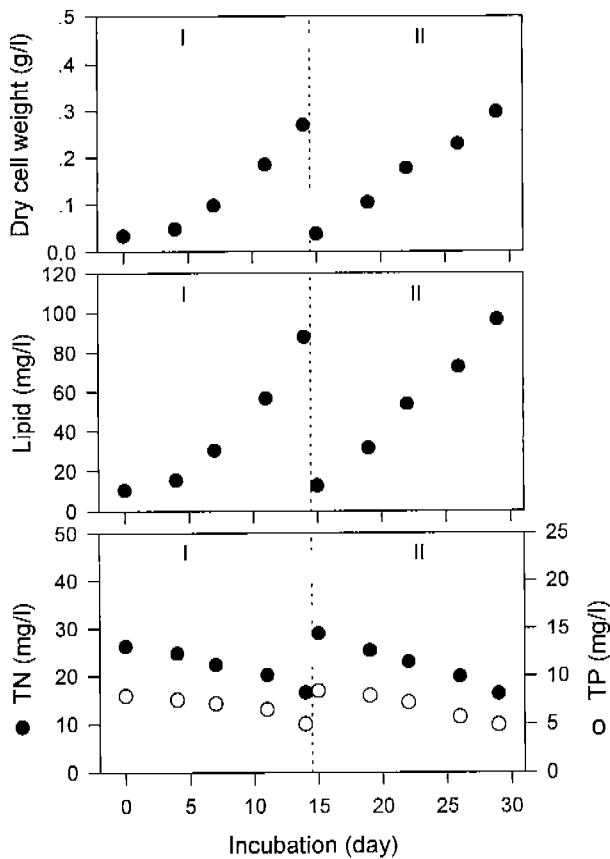


Fig. 4. Production of lipid and removal of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) from swine wastewater by *Botryococcus braunii* UTEX 572 in a tubular bioreactor.

서 동일하게 32.3%로 나타났다. 평균 건조세포중량 증가율과 지질함량 증가율이 2단계에서 약간 증가한 현상은 Fig. 3에서와 마찬가지로 배양의 단계가 진행될수록 초기의 lag phase 현상이 나타나지 않았기 때문일 것으로 생각된다.

*B. braunii*의 성장에 따라 배양액으로 공급한 축산폐수내 질소함량은 1단계에서 37.4%, 2단계에서 43.9% 감소되었으며, 인의 함량은 각각 36.7% 및 41.7% 감소되는 것으로 나타났다. 배양기간중 질소의 제거율은 1단계에서 0.70 mg N/l/d로, 2단계에서 0.91 mg N/l/d로 조사되었으며, 인의 제거율은 각각 0.21 mg P/l/d, 0.25 mg P/l/d로 나타났다. 2단계 배양에서의 질소 및 인 제거율이 1단계에서보다 높게 나타난 것은 2단계에서 *B. braunii*의 성장이 1단계에 비하여 빠르게 진행되었기 때문일 것으로 생각된다. 이상의 결과로부터 관상생물반응기로부터 *B. braunii*를 수확하고 축산폐수를 추가로 공급하여 재 배양하는 경우에도 *B. braunii*의 건조세포중량 증가율, 지질함량 증가율, 질소와 인의 제거율이 유지되는 것으로 나타났으므로 질소와 인의 제거를 위하여 이와 같은 주기적 수확 및 축산폐수 재공급의 방법을 활용할

Table 1. Growth and lipid production of *Botryococcus braunii* UTEX 572 in a tubular bioreactor

Item	Medium	
	Chu 13	Wastewater*
Growth rate of dry cell weight (mg/l/d)	20.1	18.6
Lipid production rate (mg/l/d)	6.1	6.0

\*Secondary-treated swine wastewater diluted with tap water (1:1, v/v).

수 있을 것으로 판단된다.

관상생물반응기에서 배양액으로 Chu 13 또는 50% 희석된 축산폐수를 각각 사용하고, 온도 및 CO<sub>2</sub> 공급량을 일정하게 고정한 조건에서 *B. braunii*를 대량 배양하여 얻은 결과를 종합하면 Table 1과 같다. 축산폐수를 배양액으로 공급한 경우 건조세포중량 증가율과 지질함량 증가율이 각각 18.6, 6.0 mg/l/d로 Chu 13을 배양액으로 공급한 경우와 비교하면 건조세포중량 증가율이 약간 감소하였으나 지질함량 증가율은 유사한 결과로 나타났다. 이러한 결과는 Chu 13 배양액이 *B. braunii*의 생육에 적합한 인공합성배지이며, 축산폐수에 비하여 세균과의 영양염류에 대한 경쟁이 치열하지 않으며, 조류를 영양원으로 사용하는 원생동물이 거의 존재하지 않는 반응기에서의 결과임을 고려한다면 축산폐수가 *B. braunii*의 대량배양을 위한 배양액으로 충분히 사용될 수 있음을 나타내는 결과이다. 따라서 축산폐수를 배양액으로 사용하여 *B. braunii*를 대량 배양한다면 대체에너지의 개발[8, 24]이라는 목적 이외에도 대기중의 CO<sub>2</sub>를 감소시켜 지구온난화 방지[11, 12] 및 호소의 부영양화 방지[6, 7]라는 환경적 다중효과를 동시에 기대할 수 있을 것으로 생각된다. *B. braunii*의 평균 생물량 배가시간(mean biomass doubling time)은 3.4일로 Casadevall 등[4]이 연속배양에서 보고한 2.3일에 비하여 성장이 늦은 것으로 나타났으나, 이러한 차이는 본 연구가 지질생산과 축산폐수의 처리라는 두 가지 목적을 동시에 추구하며, 개방반응기에서 배양되었기 때문으로 생각된다. *B. braunii*의 지질 생성을 및 질소와 인 제거율은 성장속도와 관련이 있는 것으로 나타났지만, 미세조류는 배양시의 광도, 광주기 조절, 영양염류의 조성, 배양온도 및 chilling effects 등에 따라 생리적 특성 및 성장속도가 변화하며 세포구성성분의 조성도 달라지므로[16, 26] 배양의 최적화를 통하여 생산수율을 향상시키기 위한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 탐색기술을 개발하여 우수 조류주를 분리하고, 유전공학기술을 이용하여 개량하며, 발전소의 냉각수 또는 축산폐수를 배양액으로 이용하고, 효율적인 반응기 개발과 배양공정을 개선하여 탄화수소의 생산비를 낮춤으로써 경제적 측면에서 화석연료와의 격차를 줄일 수 있을 것으로 생각된다[14, 21].

## 요 약

관상생물반응기를 이용한 옥외배양에서 Chu 13 및 축산폐수를 배양액으로 사용하여 미세조류 중에서 탄화수소의 세포내 축적함량이 가장 높은 것으로 알려진 *Botryococcus braunii*를 배양하였을 때 생산되는 지질함량 및 질소와 인의 제거효율을 조사하였다. Chu 13 배양액에서 *B. braunii*의 건조세포중량 증가율 및 지질함량 증가율은 온도를 25℃로 고정하고 50 ml/min의 CO<sub>2</sub>를 공급한 조건에서 각각 20.1 mg/l/d 및 6.1 mg/l/d로 가장 높게 나타났으며, 세포건조중량에 대한 지질의 함량은 모든 단계에서 30.5-34.2%로 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 수도수로 50% 희석된 축산폐수를 배양액으로 공급한 경우, 건조세포중량 증가율과 지질함량 증가율이 각각 18.6 mg/l/d 및 6.0 mg/l/d로, 건조세포 중량에 대한 평균 지질함량은 32.3%로 나타나 인공합성배지를 배양액으로 공급한 경우와 비교하여 유사한 결과가 나타났다. 또한, 축산폐수내의 총질소 및 총인 함량은 2주간의 배양 후 각각 43.9% 및 41.7%가 감소되었다. 따라서 관상생물반응기에서 축산폐수를 배양액으로 공급하여 *B. braunii*를 대량 배양한다면 대기중의 CO<sub>2</sub> 농도를 저감하고, 환경친화적인 biodiesel의 생산 및 축산폐수중 질소와 인의 제거와 같은 다중효과가 기대된다.

## REFERENCES

- 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.
- Barclay, W., C. Wyman, R. A. Lewin, and L. Cheng. 1988. Development of microalgal systems for the production of liquid fuels, pp. 55-64. In Stadler (ed.), *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London.
- 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.
- Casadevall, E., D. Dif, C. Largeau, C. Gudin, 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.
- 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.
- De la Noüe, J. and A. Basseres. 1989. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological Wastes* **29**: 292-297.
- Kim, S.-B., S. J. Lee, C.-K. Kim, G.-S. Kwon, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1998. Selection of microalgae for advanced treatment of swine wastewater and optimization of treatment condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 76-82.
- Kosaric, N. and J. Velikonja. 1995. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: Challenge and opportunities. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 111-142.
- Lee, S. J., B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1998. Rapid method for the determination of lipids from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Tech.* **12**: 553-556.
- Lee, S. J., S.-B. Kim, J.-E. Kim, G.-S. Kwon, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1998. Effects of harvesting time and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 14-18.
- Matsumoto, H., N. Shioji, A. Hamasaki, Y. Ikuta, Y. Fukuda, M. Sato, N. Endo, and T. Tsukamoto. 1995. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual fuel gas discharged from a boiler. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**: 681-692.
- Miura, Y., W. Yamada, K. Hirata, K. Miyamoto, and M. Kiyohara. 1993. Stimulation of hydrogen production in algal cells grown under high CO<sub>2</sub> concentration and low temperature. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **39/40**: 753-761.
- Murphy, J. and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analyt. Chem. Acta* **27**: 31-36.
- 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.
- 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.
- Oh, H.-M., S.-B. Kim, J.-H. Park, E.-R. Park, S.-T. Lee, G.-S. Kwon, and B.-D. Yoon. 1997. Effects of light intensity and nutrients on the growth of *Botryococcus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 339-345.
- Oh, H.-M., S. J. Lee, S.-B. Kim, M.-K. Park, B.-D. Yoon, and D.-H. Kim. 1998. Determination of limiting nutrient for algal growth by algal bioassay. *Kor. J. Limnol.* **31**: 150-157.
- Park, M.-K., S. J. Lee, H.-H. Suh, H.-S. Kim, Y. H. Kim, B.-D. Yoon, and H.-M. Oh. 1998. Advanced treatment of swine wastewater by a green alga, *Scenedesmus quadricauda*. *Algae* **13**: 227-233.
- 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.
- Templier, J., C. Largeau, and E. Casadevall. 1984. Mechanism of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* **23**: 1017-1028.
- Vazquez-Duhalt, R. and H. Greppin. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry* **26**: 885-889.

22. 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.
23. 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.
24. Wyman, C. E. and B. J. Goodman. 1993. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. *Appl. Biochem. Biotech.* **39/40**: 41–59.
25. 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.
26. 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.

(Received November 21, 1998)