Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 27, No. 2, 166–171 (1999)

축산폐수의 고도처리 및 지질생산을 위한 *Botryococcus braunii*의 대량배양

이석준 · 김성빈 · 김희식 · 권기석[1] · 윤병대 · 오희목*
생명공학연구소 환경미생물RU, [1]안동대학교 생명자원과학부

Mass Cultivation of *Botryococcus braunii* for the Advanced Treatment of Swine Wastewater and Lipid Production in a Photobioreactor. Lee, Seog June, Seong-Bin Kim, Hee-Sik Kim, Gi-Seok Kwon[1], Byung-Dae Yoon, and Hee-Mock Oh*. *Environmental Microbiology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea, [1]The School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea* – This study was conducted to investigate the removal rate of nitrogen and phosphorus, and lipid production from a swine wastewater by *Botryococcus braunii* UTEX 572 in an outdoor photobioreactor. *B. braunii* successfully predominated in competition with bacteria and other algae, especially *Oscillatoria*, which were grown spontaneously in a secondary-treated swine wastewater, under the conditions of incubation temperature at 25℃ and increased inoculum amount at 287 mg/l. There was a significant relationship between dry weight of *B. braunii* and absorbance of culture solution at 680 nm (r^2= 0.967), suggesting that the latter is as good as the former commonly used for the measurement of algal biomass which is considerably time-consuming. The removal rates of COD, TOC, total nitrogen, and total phosphorus from the swine wastewater by *B. braunii* were 0.83 mg/l/d, 0.61, 0.69, and 0.16, during an incubation of 18 days. The lipid contents of *B. braunii* on a dry weight basis in Chu 13 medium and swine wastewater were 33.2±2.6% and 32.8±3.2, respectively, which showing no difference between them. These results suggested that the mass cultivation of *B. braunii* in an outdoor photobioreactor could be used for the advanced treatment of swine wastewater and lipid production.

Key words: advanced treatment, *Botryococcus braunii*, lipid production, outdoor cultivation, photobioreactor, swine wastewater

우리 나라의 축산농가는 대부분 영세한 규모로서 고농도의 축산폐수가 제대로 처리되지 않은 상태로 하천에 유입되어 수질 악화의 중요한 요인이 되고 있으며, 특히 질소와 인에 의한 호소 부영양화가 문제시되고 있다[7, 16]. 하·폐수 처리과정에서 1, 2차 처리를 거쳐 용존유기물은 90% 정도가 제거되나 질소 및 인 화합물은 제거효율이 낮아 고도처리(3차 처리)가 필수적이다. 따라서 이 과정에서 질소와 인에 대하여 높은 축적 기능을 갖는 미세조류를 이용하면 질소와 인의 제거효율을 증대시킬 수 있다. 선진 외국에서는 방류수에 포함된 질소와 인에 대한 규제가 강화되면서 미세조류를 이용하여 산업폐수[1], 축산폐수[5], 도시하수[4]에서 이들의 제거에 관한 연구 및 기술개발이 활발히 수행되고 있다. 그러나 우리 나라에서는 질소와 인에 대한 배출규제가 본격적으로 시행된 기간이 짧고, 지금까지 질소와 인의 제거보다는 통상적으로 BOD, COD, SS(suspended solid) 등에 관심을 갖고 처리하여 왔기 때문에 하·폐수중의 질소와 인의 제거에 대한 연구가 깊이 있게 진행되지 못하고 있는 실정이다[17].

미세조류를 이용한 폐수처리의 장점은 환경친화적이며 이차오염을 발생시키지 않는 생태적 원칙을 이용한 방법이라고 Guterstam과 Todd[7]에 의하여 보고된 바 있으며, 또한 미세조류의 biomass는 종에 따라서 특별한 용도의 생물자원으로 활용할 수 있다. 대표적인 것으로 수산양식의 사료용으로 *Chlorella, Scenedesmus, Spirulina* 등이 유용한 단백질원으로 이용될 수 있음이 보고된 바 있다[16]. 군체성 녹조류인 *Botryococcus braunii*는 건조중량의 15-75%가 biodiesel로 전환될 수 있는 탄화수소로 구성되어 있고[2, 11, 12], 자연상태에서 algal bloom (수화)의 형성으로 인하여 대체에너지 자원으로서 연구되기 시작하였다. *B. braunii*에 의하여 생산된 biodiesel의 연소시 방출되는 배출가스는 기존의 디젤유와 비교하여 CO는 20%이하, NO_x는 55%, 총매연은 5% 수준이고, SO_2방출은 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 생분해성이며 독성이 거의 없으므로 환경친화적이라고도 할 수 있다[10, 22]. 그러나 *B. braunii*는 자연계에서 생장속도가 매우 느리고, 탄화수소의 함량은 비생장이나 노화시기에 높아지므로 생물연료로서 화석연료에 비하여 경제성이

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

낮은 어려움이 있다[2, 20].

따라서 *B. braunii*의 대량배양에서 생산비용을 절감하기 위하여서는 폐쇄형 반응기보다 개방형 반응시스템으로 운영하고, 광합성의 에너지원으로 태양광을 이용하며, 생산된 biomass의 생물자원으로서의 이용과 동시에 축산폐수의 처리와 같은 부가적 효과를 추구하는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 200 L 규모의 개방형 광생물반응기를 이용하여 2차 처리된 축산폐수를 배양액으로 공급하면서 *B. braunii*를 연속 배양함으로써 축산폐수로부터 질소와 인의 제거 및 생산된 조류의 biomass로부터 향후 biodiesel로 전환 가능한 지질의 생산에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

미세조류

미세조류 중에서 탄화수소함량이 높은 것으로 알려진 *Botryococcus braunii* UTEX 572는 The University of Texas at Austin에서 분양 받았으며, 미세조류의 보존 및 배양을 위하여 Chu 13 배지[12]와 축산폐수를 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 조류 배양액으로 사용하였다. 축산폐수의 물리화학적 조성은 전보[16]에서 보고한 바와 같으며, 총질소 함량이 58.7 mg/l, 총인 함량이 14.7 mg/l로 조사되었다.

광생물반응기 및 배양조건

*B. braunii*의 대량배양을 위하여 200 L 규모의 개방형 광생물반응기를 설계 제작하여 사용하였으며 모식도는 Fig. 1에 나타내었다. 배양액으로서는 Chu 13 또는 2차 처리된 축산폐수를 수도수로 50% 희석(1:1, v/v)하여 사용하였다. 광은 명(14시간)/암(10시간)의 주기로 자연광과 인공광을 조합하여 약 100 μE/m^2/s으로 조사하였고, 통기는 0.8 vvm으로 조절하였다. Chu 13 또는 축산폐수를 배양액으로 공급하여 각각 1단계 및 2단계로 나누어 배양하였으며, 1단계의 배양이 완료된 후 *B. braunii*는 Lee 등[12]의 방법에 의하여 배양액으로부터 분리하였으며, 2단계에서는 새로운 배양액을 공급하였다.

미세조류의 biomass

미세조류의 biomass는 건조중량 및 엽록소 a 함량에 의하여 산정하였다. 건조중량은 Sampling manifold(Millipore, USA)를 이용하여 시료를 glassfiber filter(Whatman GF/C)로 여과한 후 여과된 고형물을 100℃에서 12시간 건조하여 측정하였다. 엽록소 *a* 함량은 Wood [21]의 방법에 따라 시료 1 ml을 Whatman GF/C filter로 여과한 후 chloroform:methanol(2:1, v/v) 9 ml을 첨가하여 혼합한 후 4-5시간 냉장고에 보관하였다. 증류수 5.4 ml을 넣고 흔들어 준 후 냉장고에서 overnight한 다음 chloroform층을 분리하여 Fluorometer(Turner Model 450)로 형광값을 측정하여 엽록소 *a* 농도를 산출하였다.

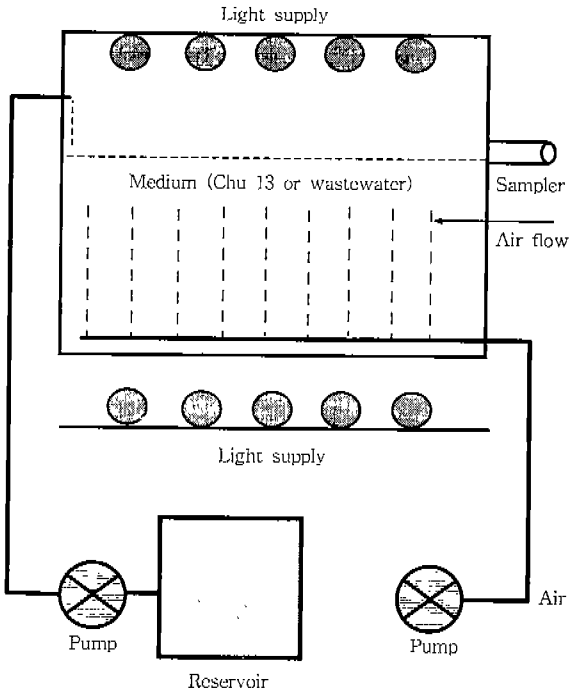

Fig. 1. Schematic diagram of a photobioreactor for algal mass cultivation.

세균수 측정

세균수 측정은 조류 배양액을 배양시간에 따라서 생리식염수에 적절한 배율로 희석하여 배양액 0.1 ml을 plate count agar(Difco)배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 배양하여, 30-300개의 colony를 형성한 plate를 선택하여 계수하였다.

이화학적 분석

축산폐수에 존재하는 총질소와 총인의 농도는 persulfate방법[6]에 준하여 분석하였다. 시료에 0.67% potassium persulfate를 첨가하고 고압멸균기를 이용하여 121℃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 산화 처리하여 질산염

과 정인산염의 형태로 변화시켰다. 질산염은 Szechrome NB 시약을 사용하여 발색시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였으며[23], 정인산염은 phosphomolybdate법[13]에 준하여 발색시킨 후 885 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다. COD는 환경오염공정시험법[8]에 따라 0.025 N $KMnO_4$ 일정량을 넣고 30분간 가열반응 시킨 후 소비된 $KMnO_4$의 양으로부터 COD를 측정하였으며, SS는 시료를 glassfiber filter로 여과하여 측정하였다. 총유기탄소(total organic carbon)는 TOC analyzer(Shimadzu 5000A)로 분석하였다.

지질의 분석

*B. braunii*의 지질성분은 주로 oleic acid 및 palmitic acid로 구성되어 있고[24], 이들 두 지방산이 CO_2로부터 탄화수소로의 생합성 과정에 중요한 전구체이므로[18], 전보[11]에서와 동일하게 탄화수소함량 대신에 지질함량을 측정하였으며, 미세조류의 세포내 지질함량은 Lee 등[11]의 방법에 준하여 분석하였다. 수확된 *B. braunii*는 Bead-beater(Biopsec 3110)로 파쇄하고 분액여두를 이용하여 chloroform:methanol(2:1, v/v) 혼합용매로 추출하였다. 조류 추출액에 증류수를 첨가하여 chloroform:methanol:water의 비율이 1:1:0.9가 되게 조절하여 분리된 chloroform층을 5% NaCl용액으로 세정하여 불순물을 제거한 후 건조시켜 지질함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

Chu 13 배지에서의 생장

B. braunii 대량배양은 200 L 광생물반응기에 운전용량을 100 L로 하고 Chu 13 배지를 배양액으로 공급하여 1단계 20일, 2단계 68일간 배양하면서 건조중량과 세균수와의 관계를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 1단계 배양(접종량 21 mg/l)에서 *B. braunii*의 건조중량은 계속적으로 증가하다가 배양 17일경 반응기내 세균수가 급격히 증가함과 동시에 감소하는 것으로 보아 세균수의 급격한 증가가 조류생장의 제한요인으로 작용하는 것으로 생각된다. 2단계 배양은 1단계 배양액을 seed로 접종(접종량 120 mg/l)하여 68일간 배양하면서 건조중량 및 세균수를 측정하였다. 건조중량은 거의 직선적으로 증가하였으며 건조중량 증가율은 31 mg/l/d로 계산되었다. 이와 같은 결과는 Okada 등[15]이 *B. braunii*의 flask를 이용한 폐쇄형 배양에서 2% CO_2를 포함한 공기의 공급과 광도를 240 $\mu E/m^2/s$로 강화한 조건에서 건조중량 증가율이 42 mg/l/d였음을 고려할 때 개방형 배양으로는 높은 수준에 있음을 알 수 있다. 세균수는 배양 16일부터 증가하기 시작하여 배양 53일에 최고인 3.2×10^9 CFU/ml로 조사되었으나, 1단계 배양과는 달리 *B. braunii*의 생장에는

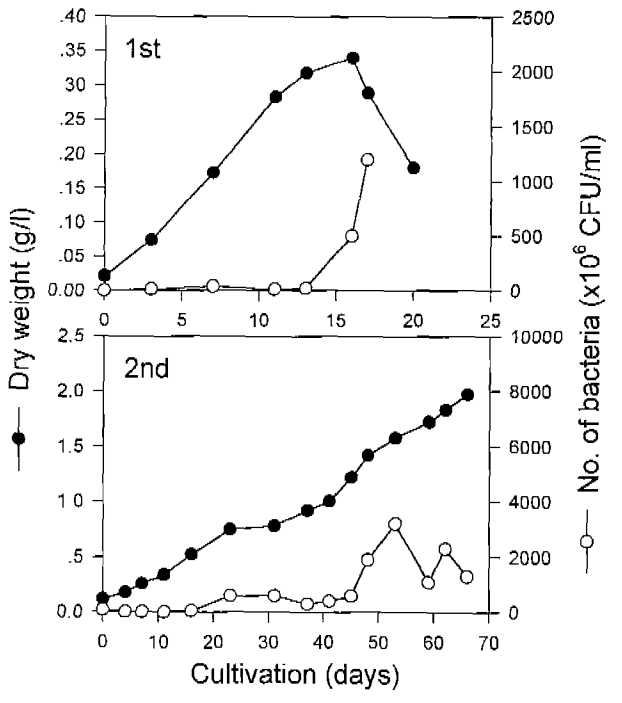

Fig. 2. Effects of bacterial density on the growth of *Botryococcus braunii* UTEX 572 in an outdoor cultivation.

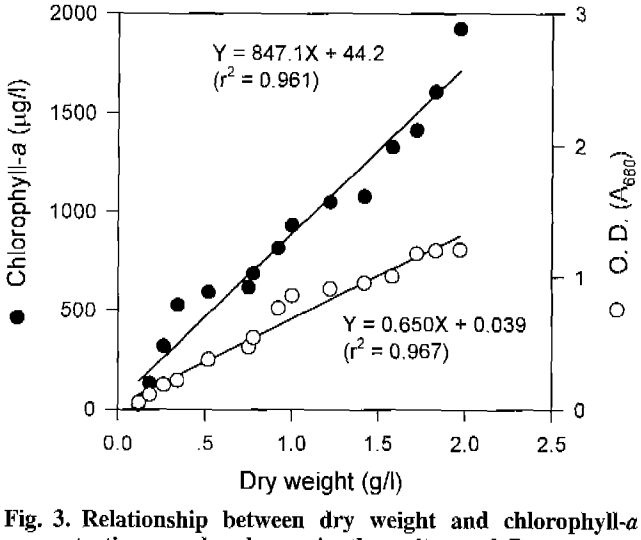

Fig. 3. Relationship between dry weight and chlorophyll-*a* concentration or absorbance in the culture of *Botryococcus braunii* UTEX 572.

큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 *B. braunii*의 개방형 배양시 초기 접종농도를 일정 수준이상으로 유지하면 세균오염에 의한 조류의 생장저해는 크지 않은 것으로 판단된다.

*B. braunii*의 2단계 배양기간중 조류 biomass의 지표로서 측정된 건조중량, 엽록소 *a* 농도, 흡광도 간의 상호관계는 Fig. 3과 같다. 건조중량과 엽록소 *a* 농도(Y=847.1X+44.2, r^2=0.961), 건조중량과 흡광도(Y=0.650X

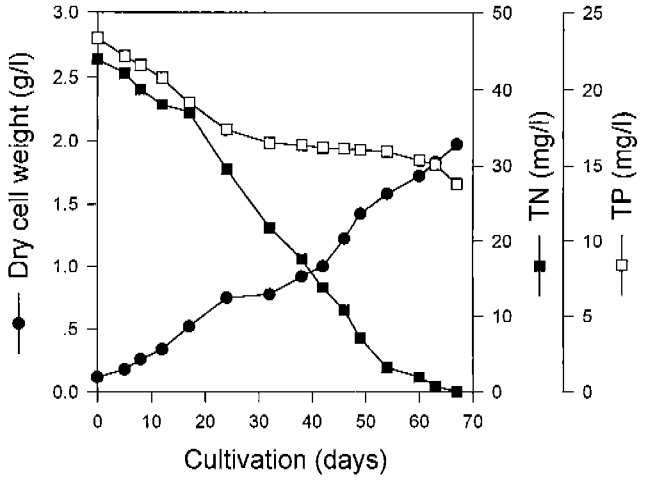

Fig. 4. Growth of *Botryococcus braunii* UTEX 572 in an outdoor photobioreactor and removal of total nitrogen (TN) and total phosphorus (TP) from Chu 13 medium.

+0.039, r^2=0.967)는 모두 매우 높은 상관을 보였다. 따라서 *B. braunii*의 대량배양시 680 nm에서 흡광도의 측정에 의하여 간편하고 신속하게 건조중량을 추정할 수 있다고 판단되었다.

Chu 13 배양액에서 질소 및 인의 제거

*B. braunii*의 2단계 배양기간중 조류의 biomass증가와 배양액내 질소 및 인의 농도변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 배지내 총질소의 농도는 배양초기에 45 mg/l에서 배양 68일에는 거의 검출되지 않아 배양액내 질소가 *B. braunii*의 생장에 모두 흡수되었으며, 이후 *B. braunii*의 생장에 제한요인으로 작용하게 됨을 추정할 수 있다. *B. braunii*의 배양에 따르는 총질소의 제거율은 배양 54일까지 0.78 mg/l/d이며, 그 이후에는 0.21 mg/l/d로 둔화되었다. 배양액내 총인의 감소는 배양 24일, 배양 54일, 배양 68일까지의 세 구간으로 구분되며, 각 구간에서의 총인 제거율은 각각 0.21, 0.07, 0.14 mg/l/d로 조사되었다. 이와 같은 결과는 *Scenedesmus quadricauda*에서 조사된[16] 총질소의 제거율 0.52 mg/l/d와 총인의 제거율 0.47 mg/l/d와 비교할 때, *B. braunii*의 폐수내 질소 제거율이 좀더 효과적이며, 인 제거율은 약 45% 수준임을 보이는 것이다. 한편 *B. braunii*의 건조중량 증가는 배양 24일 이후 세균의 밀도가 높아지는 시기에 감소하며, 이와 함께 인의 제거율이 크게 감소하였다.

축산폐수에서의 생장

*B. braunii*의 대량배양을 통하여 축산폐수의 질소와 인을 동시에 제거할 목적으로 2차 처리된 축산폐수를 50% 희석하여 배양액으로 공급한 조건에서 1, 2단계 각각 18일간 배양하여 조류의 생장을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. *B. braunii*의 건조중량과 흡광도로 측정한 생장은 유사한 경향을 나타내었다. 건조중량과 흡광도는 배양 8일까지 큰 변화가 없었으나, *B. braunii*는 배양 8일부터 축산폐수에 적응하여 급속한 생장을 보였다. 그러나 배양 8일 이후 배양액 내에는 접종 미세조류인 *B. braunii*외에 사상형 남조류인 *Oscillatoria*의 출현이 관찰되었으며, 배양기간이 경과함에 따라 *Oscillatoria*의 점유도가 증가하였고 배양 18일에는 50-60% 정도로 우점하였다. 이는 축산폐수를 배지로 사용하면서 멸균과정을 거치지 않았고, 개방형 배양으로 수행되었으므로 축산폐수내에 포함되었던 사상형 남조류가 환경의 변화에 따라 점차 우점종으로 나타나기 때문인 것으로 판단된다.

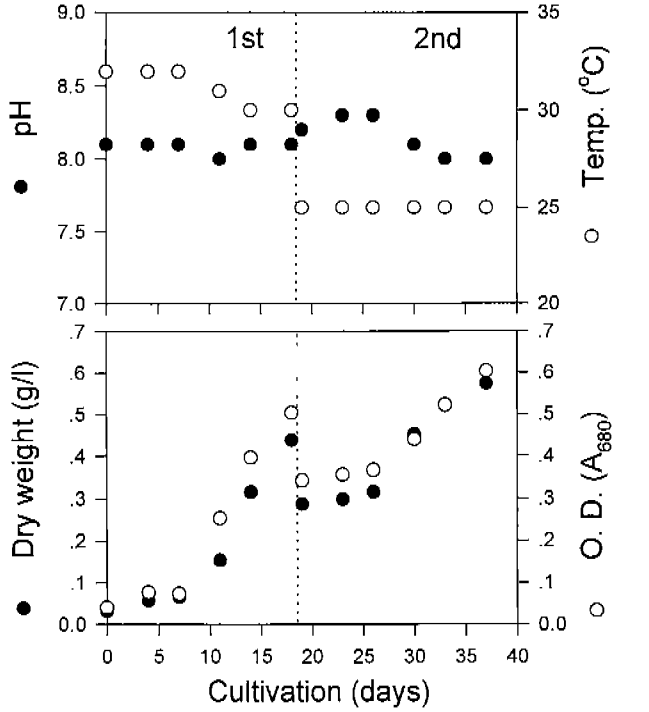

Fig. 5. Growth of *Botryococcus braunii* UTEX 572 in a secondary-treated swine wastewater.
Temperature was adjusted to 25℃ in the second stage.

*B. braunii*를 이용한 축산폐수의 고도처리와 동시에 탄화수소 생산이라는 두 가지 목적을 동시에 달성하기 위해서는 축산폐수를 배양액으로 공급함과 동시에 배양기간중 *B. braunii*가 우점할 수 있는 생육환경을 조성해 주는 것이 필요하다. 자연계에서 *B. braunii* 대량 증식의 대표적 사례로 보고된 Darwin bloom의 경우 32℃의 높은 수온과 pH 7.5-8.5의 알카리 조건이었다[19]. 이와 같은 환경조건은 일반적으로 수중에서 남조류의 증식조건과 유사한 것으로 *B. braunii*와 남조류간의 경쟁이 예상된다. 따라서, 2단계 배양에서는 남조류의 성장을 억제하기 위하여 배양액의 온도를 25℃로 유지시키고(Fig. 5), 초기 접종농도를 1단계 배양시의 건조중량 31 mg/l

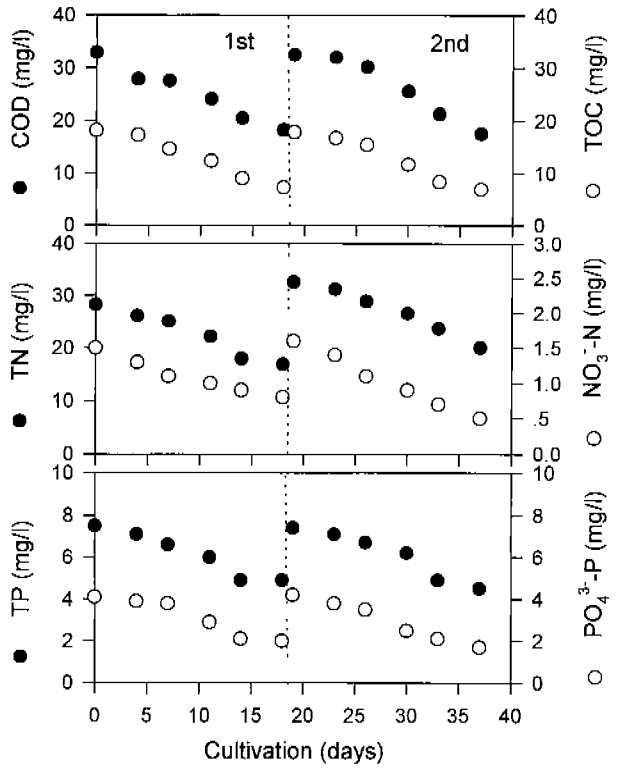

Fig. 6. Removal of organic compounds, nitrogen and phosphorus from a secondary treated swine wastewater by *Botryococcus braunii* UTEX 572 in an outdoor photobioreactor.
Abbreviations are: COD, chemical oxygen demand; TOC, total organic carbon; TN, total nitrogen; TP, total phosphorus.

로부터 2단계 배양시에는 287 mg/l로 크게 증가시킨 결과, 18일간의 배양기간중 *B. braunii*의 우점을 계속적으로 유지할 수 있었다. 이러한 결과는 *B. braunii*와 남조류의 경쟁에서 수온과 초기 접종농도가 매우 중요한 요인으로 작용함을 나타낸다. 평균 건조중량의 증가율을 비교해 보면 1단계 23 mg/l/d, 2단계 16 mg/l/d로 1단계에 비하여 낮았는데, 이는 수온이 25℃로 낮아져 *B. braunii*가 우점하면서 생장이 둔화된 때문으로 판단된다.

축산폐수의 질소와 인 제거

*B. braunii*의 생장에 따른 축산폐수내 COD, TOC, 질소 및 인의 농도 변화는 Fig. 6과 같다. COD제거율은 1, 2단계에서 각각 0.82 mg/l/d 및 0.83 mg/l/d, TOC제거율은 공히 0.61 mg/l/d로, 2단계에서는 1단계에 비하여 건조중량이 감소하였음에도 불구하고 COD와 TOC는 계속적으로 감소하는 유사한 경향을 보였다. 총질소의 제거율은 1, 2단계에서 각각 0.63 mg/l/d 및 0.69 mg/l/d로, 질산염 질소의 제거율은 1, 2단계에서 각각 0.04 mg/l/d 및 0.06 mg/l/d로 조사되었다. 총인의 제거율은 1, 2단계에서 각각 0.14 mg/l/d 및 0.16 mg/l/d로, 정인산염의 제거율은 각각 0.12 mg/l/d 및 0.19 mg/l/d로 조사되었다. 이러한 결과는 Chu 13을 배양액으로 공급한 경우(Fig. 4)와 유사한 것으로 Chu 13이 *B. braunii*의 생육에 적합한 인공합성배지이며, 축산폐수에 비하여 세균 또는 다른 조류종과의 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 본 연구에서 적용한 배양온도의 25℃로 유지, 초기 접종 조류수의 증대 등의 방법에 의하여 축산폐수를 배양액으로 공급하여 *B. braunii*를 우점 종으로 유지하면서, 폐수의 COD, TOC, 질소 및 인 성분을 효과적으로 제거할 수 있을 것으로 판단된다.

*B. braunii*는 생장율이 낮아 *Scenedesmus*나 *Chlorella*에 비하여 처리효율이 낮은 어려움이 있는데, 이러한 낮은 생장율은 *B. braunii*의 옥외배양 시 공통적으로 나타나는 현상이다[2, 20]. 그러나 *B. braunii*는 세포내에 다량의 인을 다중인산염의 형태로 저장할 수 있음이 알려져 있고[3], 미세조류는 배양시의 광도, 광주기 조절, 영양염류의 조성, 배양온도 및 chilling effects 등에 따라 생리적 특성 및 생장속도가 변화하며 세포구성성분의 조성도 달라지므로[9, 14, 24], 배양의 최적화를 통하여 생산수율을 향상시키기 위한 계속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

*B. braunii*의 지질함량

Chu 13 또는 축산폐수를 배양액으로 공급하여 2단계의 배양이 완료된 후 *B. braunii*를 수확하여 건조중량에 대한 지질함량을 조사한 결과 각각 33.2±2.6% 및 32.8±3.2%로 비슷한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 *B. braunii*의 세포내 평균 지질함량은 배양 5주까지 큰 변화가 없으며 세포건조중량의 약 32.2% 정도라는 보고[12]와 일치하였다. 이상의 결과로부터 광생물반응기로부터 *B. braunii*를 수확하고 축산폐수를 추가로 공급하여 재배양하는 경우에도 건조중량 증가율, 질소와 인의 제거율, 지질함량 등이 큰 차이가 없는 것으로 나타났으므로 질소와 인의 제거를 위하여 이와 같은 주기적 수확 및 축산폐수 재공급의 방법을 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

2차 처리된 축산폐수를 이용하여 탄화수소의 함량이 매우 높은 것으로 알려진 *Botryococcus braunii*를 개방형 광생물반응기에서 배양하면서 폐수내 질소와 인의 제거율 및 biodiesel로 전환될 수 있는 지질의 생산을 조사하였다. 개방형 배양에서 *B. braunii*는 배양온도 25℃, 초기 접종농도 287 mg/l로 조절하여 세균 및 타 조류종과

의 경쟁에서 우점적 위치를 유지할 수 있었다. *B. braunii*의 건조중량과 흡광도(Y=0.650X+0.039, r^2=0.967)는 매우 높은 상관을 나타내므로 대량배양시 680 nm에서 흡광도의 측정에 의하여 간편하고 신속하게 건조중량을 추정할 수 있다고 판단된다. 축산폐수를 배양액으로 공급하여 18일간 *B. braunii*를 배양한 결과, COD 0.83 mg/l/d, TOC 0.61 mg/l/d, 총질소 0.69 mg/l/d, 총인 0.16 mg/l/d의 제거율을 나타내었다. 건조중량에 대한 지질함량은 Chu 13의 경우 33.2±2.6%, 축산폐수를 배양액으로 공급한 경우 32.8±3.2%로 배양액의 종류에 따라 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 따라서 개방형 광생물반응기에서 축산폐수를 배양액으로 공급하여 *B. braunii*의 대량배양으로 폐수내 질소와 인의 고도처리와 함께 생산된 조류 biomass를 생물연료로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Aziz, M. A. and W. J. Ng. 1993. Industrial wastewater treatment using an activated algae-reactor. *Water Sci. Technol.* **28**: 71−76.
2. 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 (eds.), *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London.
3. 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. *Biotech. Bioeng.* **27**: 286−295.
4. De la Noüe, J. and D. Proulx. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 292−297.
5. De la Noüe, J. and A. Basserces. 1989. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biological Wastes* **29**: 17−31.
6. 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.
7. Guterstam, B. and J. Todd. 1990. Ecological engineering for wastewater treatment and its application in new England and Sweden. *Ambio.* **19**: 173−175.
8. Kim, J. T. 1992. *Standard Methods for Environmental Pollution*. Shinkwang Pub., Seoul.
9. 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.
10. Kosaric, N. and J. Velikonja. 1995. Liquid and gaseous fuels from biotechnology: Challenge and opportunities. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 111−142.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Okada, S., M. Murakami, and K. Yamaguchi. 1997. Hydrocarbon production by the Yayoi, a new strain of the green microalga *Botryococcus braunii*. *Appl. Biochem. Biotech.* **67**: 79−86.
16. 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.
17. Sung, K.-D., J.-H. Ann, J.-Y. Lee, S.-J. Ohh, and H.-Y. Lee. 1995. Kinetics of cultivating photosynthetic microalgae, *Spirulina platensis* in an outdoor photobioreactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 401−405.
18. Templier, J., C. Largeau, and E. Casadevall. 1984. Mechanism of non-isoprenoid hydrocarbon biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* **23**: 1017−1028.
19. Wolf, F. R. 1983. *Botryococcus braunii*: An unusual hydrocarbon-producing alga. *Appl. Biochem. Biotech.* **8**: 249−260.
20. 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.
21. Wood, L. W. 1985. Chloroform-methanol extraction of chlorophyll *a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**: 38−43.
22. 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.
23. 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.
24. 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 January 16, 1999)