

한국산 *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae)의 분리 및 계통분류학적 분석

이승훈^{1,3} · 이찬희² · 조범호¹ · 안치용¹ · 김한순² · 오히목^{1,3,*}

¹한국생명공학연구원 환경바이오연구센터
²경북대학교 생물학과, ³과학기술연합대학원대학교

Isolation and Phylogenetic Analysis of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) from Korean Freshwaters

Seung-Hoon Lee^{1,3}, Chan-Hee Lee², Beom-Ho Jo¹, Chi-Yong Ahn¹,
Han-Soon Kim² and Hee-Mock Oh^{1,3,*}

¹Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

²Kyungpook National University (KNU), Daegu 702-701, Korea

³University of Science and Technology (UST), Daejeon 305-350, Korea

Abstract – Recently, energy security is one of the most important world-wide issues. Biodiesel derived from microalgae has received much attention as a renewable bioenergy. The green colonial alga, *Botryococcus braunii*, is characterized by the ability to produce and accumulate large amounts of hydrocarbons and fatty acids. In this study, we have isolated 5 strains of *B. braunii* from Korean surface waters using a microcapillary-pipetting method and identified them by morphological features and phylogenetic analysis of the 18S rRNA gene. Phylogenetic analysis indicates that 5 strains of *B. braunii* are placed in the class of Trebouxiophyceae, and strains belong to race A type producing hydrocarbons which are alkadienes and alkatrienes. In addition, we need further studies to find out optimal growth conditions for producing biodiesel.

Key words : *Botryococcus braunii*, hydrocarbons, isolation, morphological identification, phylogenetic analysis

서 론

산업화와 인구증가로 인한 에너지 수요의 폭발적 증가로 한정된 화석에너지 자원이 고갈되고 있으며, 이는

전 세계적인 이슈가 되고 있다 (Chisti 2007). 따라서, 증가하는 에너지 수요를 충족하기 위해서는 대체에너지 자원의 개발이 절실히 요구된다. 최근 대체에너지 자원의 원료 중에서, 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산이 많은 관심을 받고 있다 (Casadevall *et al.* 1985; Chisti 2007). 미세조류는 광합성 미생물로서 이산화탄소를 고정하여 대기 중 온실기체를 저감시키고, 하·폐수를 이용하여 비경작지에서 배양이 가능하고, 비식량자원이며, 단위면

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

적 당 바이오매스 생산량과 지질생산량이 육상식물에 비해 훨씬 높다는 장점이 있다 (Wijffels and Barbosa 2010).

미세조류 중에서 근체성 녹조류인 *Botryococcus braunii*는 분류학적으로 Trebouxiophyceae에 포함되고 (Casadevall *et al.* 1985), 연못, 호수, 저수지 등 담수에서 algal bloom (수화)를 발생시키는 것으로 알려져 있으며, 온대, 열대, 극지방에 널리 분포하고 있다 (Hillen *et al.* 1982). *B. braunii*는 전형적으로 3차원의 무정형구조로서 그 형태가 포도 또는 서양배 (pyriform) 모양의 세포가 서로 뭉쳐 있다 (Largeau *et al.* 1980a). *B. braunii*는 많은 양의 탄화수소를 생산, 축적하기 때문에 재생에너지자원으로 주목받고 있다 (Banerjee *et al.* 2002). 자연계에서 *B. braunii*는 1976년 호주의 Darwin River Reservoir에서 대규모 bloom을 형성하여 1,500톤의 건량을 형성하고 이중 30%가 오일성분으로 조사된 바 있다 (Wake and Hillen 1980). 흥미로운 사실은 지구화학적 분석을 통해 고대 *B. braunii*의 대량 증식 및 축적이 오늘날 석유자원의 근원이라는 추정이 있다 (Moldowan and Seifert 1980).

*B. braunii*는 세포 내외에 생성, 축적되는 탄화수소의 종류에 따라서 race A, race B, race L의 3 type으로 분류된다. Race A는 탄소수 C₂₃-C₃₃의 지방산에서 유래된 al-kadienes과 alkatrienes를 생성한다. Race B는 탄소수 C₃₀-C₃₇의 메틸기 치환된 botryococcene, squalene과 같은 triterpenes를 생성한다. Race L은 tetraterpene과 lycopadiene을 축적한다. *B. braunii*는 이러한 재생가능한 에너지원인 탄화수소를 건조중량의 26~86%로 많이 축적한다 (Metzger and Largeau 2005). *B. braunii*에서 생성된 탄화수소는 촉매반응으로 크래킹된 후 C₇H_n-C₁₁H_m은 가솔린, C₁₂-C₁₅는 항공연료, C₁₆-C₁₈은 디젤로 전환이 가능하다 (Hillen *et al.* 1982; Banerjee *et al.* 2002).

본 연구에서는 전국적으로 물 시료를 채취하여 도립 현미경을 이용하여 검경하였고, 5 strains의 *B. braunii*를 분리하였다. 광학현미경을 이용하여 분리한 *B. braunii*를 관찰하고, 형태학적 특징을 바탕으로 동정하였으며, 18S rRNA sequence analysis를 통해 *B. braunii*의 분자적 동정을 시도하였다. 또한, 본 연구에서 분리한 *B. braunii*와 해외에서 도입한 *B. braunii*의 18S rRNA sequence를 바탕으로 계통분류학적인 관계를 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 한국산 *Botryococcus braunii*의 분리 및 형태학적 동정

한국 내 분포하는 *B. braunii*를 분리하기 위하여 강원

도, 경상북도, 제주도 내의 총 5지역에서 플랑크톤 네트를 이용하여 미세조류를 농축한 담수시료를 채취하였다 (Table 1). 각 담수시료를 도립현미경 (Nikon TMS-F, Japan)상에서 *B. braunii*의 형태학적 특징에 근거하여 검경하여 microcapillary-pipetting method를 이용하여 분리하였다 (Oh and Rhee 1990). 분리된 *B. braunii*는 수정된 BG-11 배지 (Dayananda *et al.* 2007)에서 배양하였고, 그 조성은 (mg L⁻¹): NaNO₃ (1500), K₂HPO₄ · 3H₂O (39), MgSO₄ · 7H₂O (75), CaCl₂ · 2H₂O (36), Citric acid (6), Ammonium ferric citrate (6), Na₂-EDTA (1), Na₂CO₃ (21), H₃BO₃ (0.00286), MnCl₂ · H₂O (0.00181), ZnSO₄ · 7H₂O (0.000222), CuSO₄ · 5H₂O (0.000079), Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.000391), Co (NO₃)₂ · 6H₂O (0.0000494)이다. 배지는 121°C에서 15분간 멸균하였다. 분리된 *B. braunii*를 광학현미경 (Nikon Eclipse 80i, Japan) 100~1,000배율 하에서 검경하고, 사진을 촬영하여 형태학적으로 동정하였다 (Yamagishi and Akiyama 1984; 정 1993).

2. Nile Red 염색

분리된 *B. braunii* 배양액의 1 mL에 Nile Red (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) 5 mg을 20 mL의 아세톤에 녹인 염색액을 4 μL를 첨가하여 교반한 다음 5분 후 공초점형광현미경 (confocal fluorescence microscope, ZEISS LSM510Meta, Germany)과 형광현미경 (Nikon Eclipse 80i, Japan)을 이용하여 490 nm에서 여기 (excitation)시키고 585 nm에서의 방출 (emission)을 측정하여, 세포 내외에 존재하는 지질과 탄화수소를 관찰하였다 (Lee *et al.* 1998).

3. DNA 증폭 및 염기서열 분석

Genomic DNA를 분리하기 위하여 배양된 *B. braunii*를 원심분리기로 4,000 rpm에서 농축하였다. Genomic DNA는 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 추출하였다. MJ MINI Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 하였다. 분리된 *B. braunii*로부터 18S rRNA sequence를 증폭하기 위하여 녹조류에 특이적인 primer set (forward, 5'-CGACTTCTGGAAGGGACGTA-3'; reverse, 5'-GAATCAACCTGACAAGGCAAC-3')를 사용하였다. PCR 반응 조건은 총 30 cycle을 하고 94°C에서 5분간 초기 열처리를 한 후, 94°C에서 1분간 변성시키고, annealing은 55°C에서 1분을 수행하고, 신장을 위하여 72°C에서 1분간 반응시킨 후 최종적으로 72°C에서 10분간 처리하고 반응을 중단

시켰다(Moro *et al.* 2009). PCR 반응은 Maxime PC PreMix Kit (Intron Biotechnology, Korea)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하였다. PCR 산물을 ethidium bromide를 첨가한 1.0% agarose gel (Sigma-Aldrich, USA)에 loading한 후 전기영동하여 ultraviolet transilluminator를 이용하여 산물의 위치를 확인한 후 Gel extraction kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다(고 등 2004). 정제된 PCR 산물은 automatic DNA sequencer (model 377, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

4. 계통분류학적 분석

분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequence는 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search program을 통해 비교, 분석하였다. 또한, Senousy *et al.* (2004)과 Weiss *et al.* (2010)에서 얻은 accession numbers를 참고하여, GenBank database에 등록된 미세조류주의 18S rRNA sequence (*Botryococcus*, *Chlorella*,

Scenedesmus)를 이용하여 계통분류학적 분석을 수행하였다(Table 3). Clustal X 소프트웨어(자동 설정값)를 이용하여 염기서열을 동일한 값으로 정렬하였다. 이때, 변이가 심한 영역은 BioEdit 7.0을 이용하여 육안으로 교정하였다. 계통분류학적 분석은 배열한 18S rRNA sequence를 MEGA4.0에서 Neighbor-Joining 방법으로 실시하였다. Bootstrap 분석은 1,000회의 resampling을 통하여 조사하였다(Tamura *et al.* 2007).

결과 및 고찰

1. 한국산 *Botryococcus braunii*의 분리 및 형태학적 동정

전국적으로 강원도 정선군의 도롱이 연못, 경상북도 청송군의 마뜰못, 제주도 애월읍의 숨은물뱅디와 외도동 광령지, 경상북도 경산시의 구룡저수지 등 5곳의 담수에

Table 1. Sampling site and date for the isolation of *Botryococcus braunii* strains from Korean waters

Strain	Isolation site	Latitude/Longitude	Date
KNU2	Dorongyi Pond	37° 11'N/128° 48'E	2010.04.24
KNU5	Matteul Pond	36° 22'N/129° 04'E	2010.04.25
KNU6	Sumeunmulbaengdui Swamp	33° 21'N/126° 27'E	2010.09.04
KNU7	Gwangryeong Pond	33° 28'N/126° 25'E	2011.04.19
KNU8	Guryoung Reservoir	33° 21'N/126° 27'E	2011.06.06

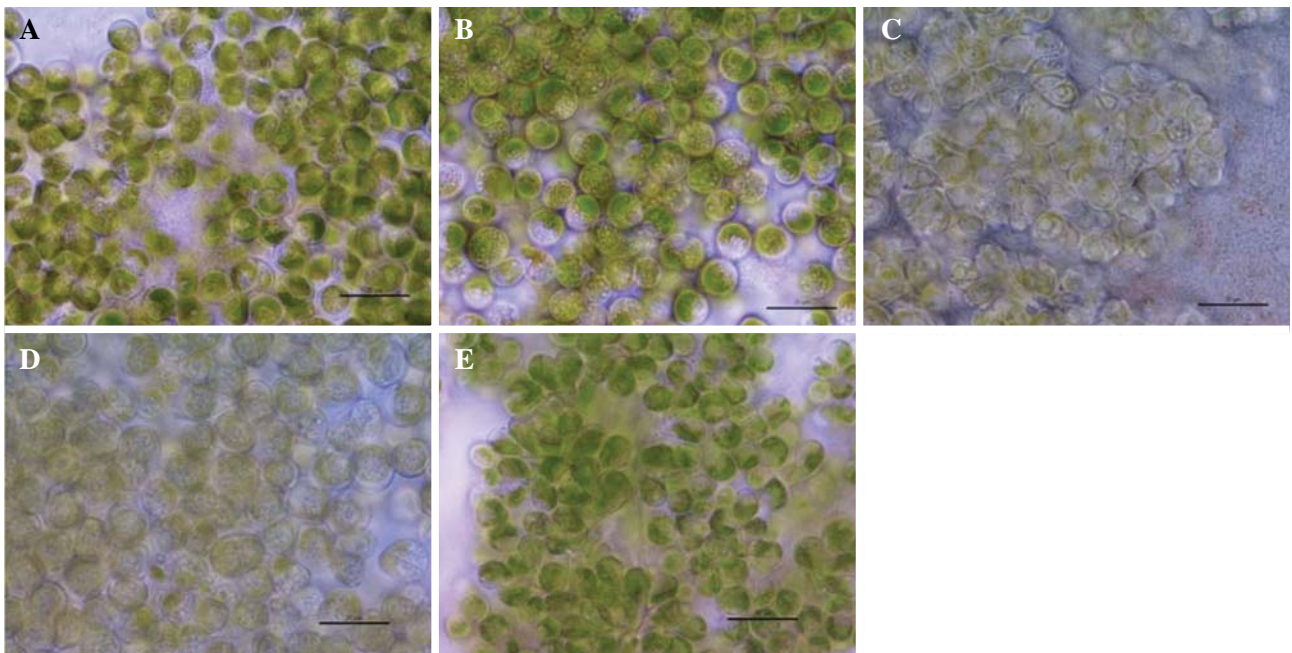
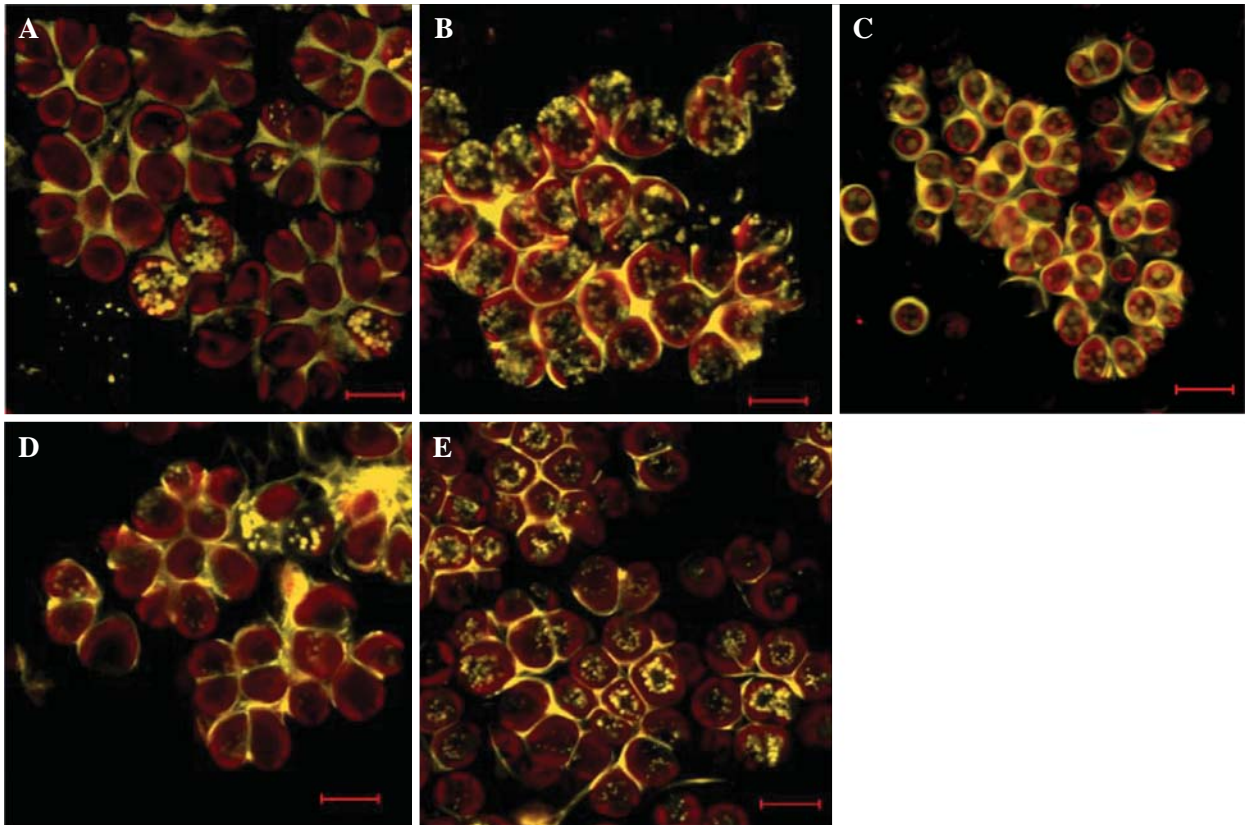


Fig. 1. Light micrographs of *Botryococcus braunii*. (A), *B. braunii* KNU2; (B), *B. braunii* KNU5; (C), *B. braunii* KNU6; (D), *B. braunii* KNU7; (E), *B. braunii* KNU8. Scale bar indicates 20 μ m.

Table 2. The morphological characteristics of *Botryococcus braunii* strains isolated from Korean waters

Strain	Cell size (μm)	Gelatinous sheath size (μm)	Colony size (μm)	Gelatinous sheath size/Cell size (%)
KNU2	11.1 ± 0.9	1.24 ± 0.34	49.3 ± 8.8	11
KNU5	11.5 ± 1.0	0.60 ± 0.18	60.0 ± 12.3	5
KNU6	8.7 ± 1.0	1.88 ± 0.19	76.5 ± 12.5	22
KNU7	12.0 ± 0.3	1.65 ± 0.34	49.6 ± 0.9	14
KNU8	9.5 ± 1.7	0.73 ± 0.16	45.5 ± 0.9	8

**Fig. 2.** Fluorescence micrographs of *Botryococcus braunii* stained with Nile Red. (A), *B. braunii* KNU2; (B), *B. braunii* KNU5; (C), *B. braunii* KNU6; (D), *B. braunii* KNU7; (E), *B. braunii* KNU8. Scale bar indicates 10 μm .

서 2010년 4월부터 2011년 6월에 걸쳐 플랑크톤 네트를 이용하여 미세조류를 농축한 담수시료를 채취하였다 (Table 1). 각 담수시료에서 *Botryococcus braunii*의 출현을 확인하고 microcapillary-pipetting method를 이용하여 *B. braunii* KNU2, 5, 6, 7, 8의 5주를 분리하였다.

분리된 *B. braunii*를 광학현미경 하에서 검경하고, 사진을 촬영하여 형태학적인 특징을 분석하였다 (Fig. 1). *B. braunii*는 삼차원의 무정형 군체를 형성하였으며, 그 군체는 투명하거나 노르스름한 점액질에 둘러싸여 있었고, 각각의 군체에 길거나 짧은 젤라틴성 가닥 (strand)으로 연결되어 있었다. 분리된 *B. braunii*의 군체, 세포, 세

포를 둘러싼 점액질의 크기를 측정하였다 (Table 2). *B. braunii* KNU2, 5, 7, 8은 평균 직경이 45.5~60.0 μm 로 유사한 크기의 군체를 형성하였고, *B. braunii* KNU6은 다른 분리된 *B. braunii*에 비해서 상대적으로 크기가 큰 평균 직경이 76.5 μm 의 군체를 형성하였다. 젤라틴으로 싸여진 군체의 내부에는 난형 혹은 서양배모양의 세포가 주변의 세포 무리와 방사적으로 배열되어 있었고, *B. braunii* KNU2, 5, 7, 8의 세포 지름은 평균 직경이 9.5~12.0 μm 였다. 그러나 *B. braunii* KNU6은 분리된 다른 *B. braunii*보다 평균 직경이 8.7 μm 로 짧고 세포의 모양이 더욱 불규칙한 형태이며, 3~5개 또는 그 이상의 세포가

더 두꺼운 젤라틴 속에 박혀있는 형태였다.

녹조류의 분류군에서 트레복시아조강 (Trebouxiophyceae)은 편모가 없는 단세포나 군체, 사상체이며, 주요 계통군 중에서 *Botryococcus* 속은 4개의 종 (*braunii*, *terribilis*, *protuberans*, *sudetica*)이 보고되었으며, 이 중에서 *B. braunii*는 난형 또는 구형의 작은 세포가 길거나 짧은 젤라틴성 가닥으로 연결되어 불규칙한 모양의 군체를 형성한다(정 1993). 세포는 난형 또는 구형의 형태이며, 이들은 각각 주변의 세포 무리와 방사적으로 배열되어 있다. 또한 강하고 투명한 젤라틴성 점액질에 싸여있다. 각 군체에는 16, 32개 또는 그 이상의 세포가 함께 있으며, 각 세포는 한 개의 엽록체를 갖고 있으며, 세포의 지름은 3~6 μm , 길이는 6~11 μm 로 알려져 있다 (Yamagishi and Akiyama 1984).

분리된 *B. braunii*를 Nile Red로 염색한 후 공초점형광 현미경과 형광현미경을 이용하여 세포 내외에 존재하는 지질과 탄화수소를 관찰하였다 (Fig. 2). *B. braunii*가 생산하는 탄화수소의 대부분을 세포 밖에 저장하고, 세포 내에는 미량을 저장한다 (Largeau *et al.* 1980b). 전반적으로 *B. braunii*는 세포 내에서 둥근 형태의 지방 과립을 보였고, 세포 밖의 젤라틴성 점액질에 훨씬 많은 비율로 탄화수소를 보였다. 그러나 *B. braunii*의 세포내 지질 과립의 양과 세포 밖의 탄화수소의 양에는 차이가 있었다. *B.*

braunii KNU2, 7은 세포 내의 지방과립의 양이 분리된 다른 *B. braunii*보다 작고, *B. braunii* KNU5, 6, 8은 세포 내의 지방과립의 양이 많았다. 특히, *B. braunii* KNU6는 세포 내의 지방과립의 크기가 분리된 다른 *B. braunii*보다 크며, 세포 밖의 탄화수소의 양이 훨씬 많았다. 이는, 세포 밖의 탄화수소가 포함되어 있는 점액질의 비율이 *B. braunii* KNU6가 가장 크기 때문인 것으로 사료된다 (Table 2).

분리된 5 strains의 *B. braunii*가 분리된 장소에 따라서 형태적으로 군체의 크기, 세포의 크기와 모양, 군체를 둘러싸고 있는 젤라틴성 점액질의 두께 등에 다소 변이를 보였으나, 세포 내의 지방 과립의 양과 세포 밖의 점액질에 포함된 탄화수소의 양은 큰 차이를 나타내었다. 특히, *B. braunii* KNU6는 다른 분리된 *B. braunii* 주에 비해서 군체의 크기가 크고, 군체와 세포를 둘러싸고 있는 젤라틴성 점액질의 두께가 두꺼우며, 세포 밖의 탄화수소의 양이 훨씬 많았다. 그러나 *B. braunii* KNU6와 같이 제주도에서 분리된 *B. braunii* KNU7은 위와 같은 특징을 보이지 않았으며, *B. braunii* KNU5와 *B. braunii* KNU8 역시 경상북도에서 분리 되었으나 군체의 크기와 세포모양 등에 큰 차이가 있는 것으로 보아 한국 내에서 분리된 *B. braunii*의 지역적 변이는 없는 것으로 사료된다.

Table 3. A list of *Botryococcus*, *Chlorella* and *Scenedesmus* species included in this study for phylogenetic analysis and GenBank accession numbers for their 18S rRNA sequences

Species	Strain	Accession no.	Sequence length (bp)
<i>Botryococcus braunii</i>	Titicaca	AJ581912	2,453
<i>Botryococcus braunii</i>	CCAP 807/1	AJ581913	2,974
<i>Botryococcus braunii</i>	AGB-Bb01	GU951518	2,512
<i>Botryococcus braunii</i>	AGB-Bb02	GU951519	2,436
<i>Botryococcus braunii</i>	AGB-Bb03	GU951520	2,477
<i>Botryococcus braunii</i>	Songkla Nakarin	AJ581911	2,469
<i>Botryococcus braunii</i>	Kawaguchi-1	HM245349	1,725
<i>Botryococcus braunii</i>	Kawaguchi-2	HM245350	1,721
<i>Botryococcus braunii</i>	Ayame	AJ581910	2,487
<i>Botryococcus braunii</i>	Yayoi	HM245351	1,723
<i>Botryococcus braunii</i>	Showa	FJ807044	1,766
<i>Botryococcus braunii</i>	Yamanaka	HM245352	1,723
<i>Botryococcus</i> sp.	Tow 9/21	AY197640	1,798
<i>Botryococcus braunii</i>	KNU2	JQ390613	1,076
<i>Botryococcus braunii</i>	KNU5	JQ390614	980
<i>Botryococcus braunii</i>	KNU6	JQ390615	1,079
<i>Botryococcus braunii</i>	KNU7	JQ390616	1,050
<i>Botryococcus braunii</i>	KNU8	JQ390617	1,051
<i>Chlorella saccharophila</i>	KMMCC FC-5	HQ702322	2,033
<i>Chlorella vulgaris</i>	KMMCC EC-5	HQ702321	2,033
<i>Chlorella sorokinian</i>	GXNN 01	EU402596	1,708
<i>Scenedesmus</i> sp.	CCAP 217/8	FN298925	2,944
<i>Scenedesmus pectinatus</i>	MIC-G8	JF834707	1,779
<i>Scenedesmus bajacalifornicus</i>	ZAI-7	HQ246322	1,750
<i>Scenedesmus pupukensis</i>		AB255363	2,509

2. DNA 증폭과 염기서열 분석

분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequencing 후, BLAST search를 통해 분석하였다. 분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequence의 범위는 980~1,079 bp이고, 모두 GenBank에 등록하였다. 18S rRNA sequence의 accession number와 sequence length는 Table 3에 나타내었다. 광학현미경 관찰을 통한 형태적인 동정 결과에서와 동일하게 BLAST search를 통해 분리된 모든 미세조류주가 *B. braunii*와

Table 4. The similarity between amplified sequences and the closest relative sequence for *Botryococcus braunii* strains isolated from Korean waters

Strain	Closest relative and GenBank accession number	Similarity (%)
KNU2	<i>Botryococcus braunii</i> FR865761	99
KNU5	<i>Botryococcus braunii</i> HM245352	98
KNU6	<i>Botryococcus braunii</i> GU951518	98
KNU7	<i>Botryococcus braunii</i> HM245352	99
KNU8	<i>Botryococcus braunii</i> HM245352	99

가장 높은 상동성을 나타낸 것으로 확인되었다 (Table 4). *B. braunii* KNU2, *B. braunii* KNU6의 18S rRNA sequence는 *B. braunii* (GenBank accession No. FR865761), *B. braunii* (GenBank accession No. GU951518)와 각각 99%, 98%로 가장 높은 상동성을 보였다. 또한, *B. braunii* KNU5, *B. braunii* KNU7, *B. braunii* KNU8의 18S rRNA sequence는 모두 *B. braunii* (GenBank accession no. HM245352)와 각각 98%, 99%, 99%로 높은 상동성을 보였다. 따라서, 분리된 5 미세조류주의 염기서열이 모두 GenBank에 보고된 *B. braunii*의 18S rRNA sequence와 매우 높은 상동성을 보여 형태적 형질을 이용한 동정의 결과와 일치하였다.

제주도에서 분리된 2 strains의 *B. braunii*의 18S rRNA sequence와 가장 높은 상동성을 보이는 미세조류주가 다르지만, 경상북도의 마뜰못, 구룡저수지에서 분리된 *B. braunii*와 제주도의 광령지에서 분리된 미세조류주의 18S rRNA sequence와 가장 높은 상동성을 보이는 미세조류주가 서로 같은 것으로 보아, 한국산 *B. braunii* 18S

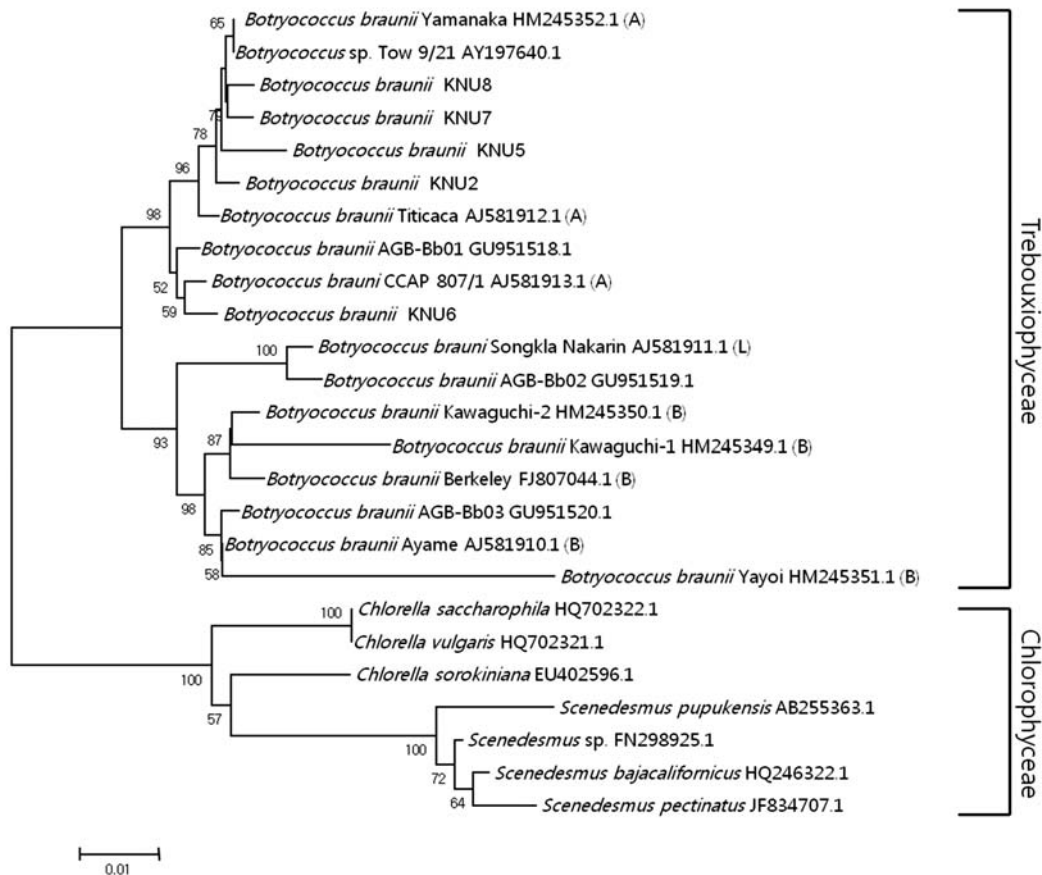


Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationship among 18S rRNA sequences of 5 *B. braunii* strains from Korean waters and 13 *B. braunii* strains, 3 *Chlorella* strains and 4 *Scenedesmus* strains from NCBI nucleotide database. A, B, and L types are given in parentheses at the end of each strain.

rRNA sequence의 지역적 상동성과 특이성은 없으므로 사료된다.

3. 계통분류학적 분석

한국산 *B. braunii*의 진화, 계통분류학적 관계를 분석하기 위하여, 본 연구에서 분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequence와 GenBank에 등록되어 있는 *Botryococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*의 18S rRNA sequence를 이용하여 Neighbor-Joining 방법으로 분석하였다. 분석에 사용된 미세조류주의 18S rRNA sequence는 Table 3에 나타내었다. 계통분류학적 분석의 결과(Fig. 3), 분리된 *B. braunii*와 GenBank에 보고된 *B. braunii*는 단일 계통인 Trebouxiophyceae으로 분지되었으며, Chlorophyceae의 *Chlorella*와 *Scenedesmus*의 분류군과는 뚜렷하게 구분되었다. 이는 형태학적 형질을 이용한 동정 결과와 일치하였다.

B. braunii KNU2, 5, 7, 8은 분류군 내에서 매우 가까운 거리에 위치하였으나, *B. braunii* KNU6는 다른 분리된 *B. braunii*와는 같은 분류군 내에서 멀리 떨어진 거리에 위치하였다. 즉, *B. braunii* KNU2, 5, 7, 8은 18S rRNA sequence를 이용한 계통분류학적 분석을 통해서 매우 유사한 미세조류주로 사료되며, *B. braunii* KNU6는 다른 분리된 *B. braunii*와는 차이가 있을 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 군체 크기, 점액질의 두께, 탄화수소 양 등에 기반한 형태적 분석의 결과 *B. braunii* KNU6가 다른 분리된 *B. braunii* 주와 구분되는 것과 일치한다.

18S rRNA sequence에서 가까운 거리에 위치한 *B. braunii* KNU2, 5, 7, 8은 조금의 차이는 있으나 군체의 크기와 세포의 모양과 크기 등 형태적으로 유사하였으나, 멀리 떨어진 거리에 위치한 *B. braunii* KNU6는 다른 분리된 *B. braunii*에 비해서 군체의 크기가 크고, 세포의 크기가 작으며, 군체를 둘러싸고 있는 젤라틴성 점액질의 두께가 더욱 두꺼운 형태적인 차이를 보이고, 세포 내의 지방과립의 양과 크기, 그리고 세포 밖의 탄화수소의 양이 분리된 다른 *B. braunii*보다 많았다. 이는 한국 내에서 분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequence를 이용한 계통분류학적 분석 결과와 형태적인 특징이 서로 무관하지 않음을 나타내었다.

*B. braunii*는 생산하는 탄화수소의 종류에 따라서 뚜렷한 세 개의 race type으로 정의된다(Metzger and Largeau 2005). 또한 세 개의 race type은 계통분류학적 분석을 이용하여 뚜렷하게 구분된 분류군을 형성한다(Senousy et al. 2004; Weiss et al. 2010). 본 연구에서도, 이전의 연구 결과와 동일하게 단일분류군인 Trebouxiophyceae는 race A type을 포함하는 계통과 race B type, race L type을 포

함하는 계통으로 뚜렷하게 분리된 분류군을 형성하였다. Race B type와 race L type이 Trebouxiophyceae의 분류군 내에서 가까운 거리에 있는 것은 두 type 모두 Isoprenoid 유래의 탄화수소를 생산하기 때문이라고 제안되었으며(Weiss et al. 2010), Race A type은 지방산 유래의 탄화수소를 생산한다고 알려져 있다. 계통분류학적 분석의 결과로 보아 한국에서 분리된 *B. braunii*는 모두 race A type의 분류군에 함께 포함되었다. 따라서 본 연구에서 분리된 모든 *B. braunii*는 race A type 이고, 탄소수 C₂₃-C₃₃의 탄화수소인 alkadienes과 alkatrienes를 생산하는 것으로 사료된다. 향후, *B. braunii*를 이용한 바이오디젤을 생산하기 위하여, 최적의 배양조건을 찾는 연구가 필요하다.

적 요

한국 내 전국적으로 5곳의 담수에서 2010년 4월부터 2011년 6월에 걸쳐 담수시료를 채취한 후, 각 담수시료에서 *Botryococcus braunii*의 출현을 확인하고 microcapillary-pipetting method를 이용하여 5주를 분리하였다. 분리된 *B. braunii*의 18S rRNA sequencing 후, BLAST search를 통한 분석 결과는 *B. braunii*와 가장 높은 상동성을 나타낸 것으로 확인되어 형태적 동정결과와 일치하였다. 진화, 계통분류학적 분석결과, 분리된 5주의 *B. braunii*는 단일 계통인 Trebouxiophyceae으로 분류되었다. 18S rRNA sequence의 계통 분류학적 분석에서 *B. braunii* KNU6는 다른 분리된 *B. braunii*와 같은 분류군 내에서 거리의 차이가 있었고, 또한 세포크기, 점액질의 양 등의 형태적 특징도 차이를 보였다. 한국에서 분리된 5주의 *B. braunii*는 모두 race A type의 분류군에 포함되며, 탄소수 C₂₃-C₃₃의 지방산에서 유래된 alkadienes과 alkatrienes를 생산하는 것으로 사료되며, *B. braunii*를 이용한 바이오디젤을 생산하기 위한 최적의 배양조건을 찾는 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부 글로벌프린티어사업(Advanced Biomass R&D Center)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

고소라, 박성주, 안치용, 최애란, 이정숙, 김희식, 윤병대, 오희

- 목. 2004. DGGE를 이용한 대청호 수화발생시기의 세균 군집 분석. 한국미생물학회지. 40:205-210.
- 정 준. 1993. 한국담수조류도감. 도서출판 아카데미서적. 서울. 466pp.
- Banerjee A, R Sharma, Y Chisti and UC Banerjee. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Crit. Rev. Biotechnol. 22:245-279.
- 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.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25:294-306.
- Dayananda C, R Sarada, MU Rani, TR Shamala and GA Ravishankar. 2007. Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. Biomass Bioenerg. 31:87-93.
- Hillen LW, G Pollard, LV Wake and N White. 1982. Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels. Biotechnol. Bioeng. 24:193-205.
- Largeau C, E Casadeval and C Berkaloff. 1980a. The biosynthesis of long-chain hydrocarbons in the green alga *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 19:1081-1085.
- Largeau C, E Casadeval, C Berkaloff and P Dhamelincourt. 1980b. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. Phytochemistry 19:1043-1051.
- 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.
- Metzger P and C Largeau. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:486-496.
- Moldowan JM and WK Seifert. 1980. First discovery of botryococcane in petroleum. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 19:912-914.
- Moro CV, C Olivier, R Séréña, T Antoine, C Gérard, B Isabelle and B Jacques. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 75:5729-5733.
- Oh HM and GY Rhee 1990. Preparation of unialgal cultures from natural waters by a micropipette technique. Kor. J. Phycol. 5:131-136.
- Senousy HH, GW Beakes and E Hack. 2004. Phylogenetic placement of *Botryococcus braunii* (Trebouxiophyceae) and *Botryococcus sudeticus* isolate UTEX 2629 (Chlorophyceae). J. Phycol. 40:412-423.
- Tamura K, J Dudley, M Nei and S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.
- 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.
- Weiss TL, JS Johnston, K Fujisawa, K Sumimoto, S Okada, J Chappell and TP Devarenne. 2010. Phylogenetic placement, genome size, and GC content of the liquid-hydrocarbon-producing green microalga *Botryococcus braunii* strain Berkeley (showa) (Chlorophyta). J. Phycol. 46:534-540.
- Wijffels RH and MJ Barbosa. 2010. An outlook on microalgal biofuels. Science 329:796-799.
- Yamagishi T and M Akiyama. 1984. Guide Book to Photomicrographs of the Freshwater Algae. Uchida Rokakuho.

Received: 5 February 2012

Revised: 20 February 2012

Revision accepted: 24 February 2012